



TITLE:

コナダニ分泌成分の機能と化学(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

佐藤, 正資

CITATION:

佐藤, 正資. コナダニ分泌成分の機能と化学. 京都大学, 1997, 博士(農学)

ISSUE DATE:

1997-03-24

URL:

<https://doi.org/10.11501/3123635>

RIGHT:

コナダニ分泌成分の機能と化学

1997

佐藤正資

目次

頁

I. オソアシプトコナダニの2種の性フェロモン

1. 緒論	1
2. 材料および方法	3
(1) 供試ダニの飼育法	3
(2) 抽出法	3
(3) 生物試験法	4
(4) 性フェロモンの精製・分析に用いた分析法および使用機器	6
(5) 二重結合位置の決定法	9
(6) ガスクロマトグラフィーを用いた性フェロモンの定量	9
3. 性フェロモンの同定	11
(1) 粗抽出物での予備試験	11
(2) 雌分泌性の性フェロモンの同定	11
(a) 雌分泌性の性フェロモンの精製と各画分の生物試験結果	11
(b) 化合物 A の構造決定	17
(c) 合成 2,6-HIMBDでの生物試験	21
(3) 雄分泌性の性フェロモンの同定	22
(a) 雄分泌性の性フェロモンの精製と各画分の生物試験	22
(b) 雄分泌性の性フェロモン活性画分に含まれる 成分の構造決定	23
(c) heptadecene および heptadecadiene の二重結合位置 および幾何構造の決定	28
(d) 活性画分の再分画とその生物試験	33
(e) 合成炭化水素混合物の生物試験	35
(4) GC による雌雄, および若虫分泌成分の比較と 性フェロモンの定量	37
4. 性フェロモン成分の合成	40
(1) 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde の合成	40

(2) (Z,Z)-6,9-heptadecadiene および (Z)-8-heptadecene の合成	44
5. 考察	49
II. ヤケヒョウヒダニからの新規サリチルアルデヒド類縁体の同定	
1. 緒論	52
2. 材料および方法	54
(1) 供試ダニとその飼育法	54
(2) 抽出法	54
(3) 未同定化合物の精製, 構造決定に用いた分析法および使用機器	54
3. 未同定化合物の構造決定	56
(1) 未同定化合物の単離	56
(2) 化合物 G の構造解析	58
4. 2-formyl-3-hydroxybenzyl formate の合成	63
5. 考察	70
III. コナダニ類における脂肪酸とそのメチルエステルの食餌誘引・定着活性	
1. 緒言	73
2. 材料と方法	75
(1) 供試したダニとその飼育法	75
(2) 生物試験法	76
(3) 試験した化合物	78
(4) 脂肪酸のメチルエステル化	78
3. 脂肪酸とそのメチルエステルの誘引・定着活性	80
4. 考察	84
摘要	87
謝辞	89
引用文献	90

I. オソアシプトコナダニの2種の性フェロモン

1. 緒論

フェロモンとは、ある個体から分泌され同種他個体に、特異な行動あるいは生理作用を引き起こす物質と定義される。これらの物質は個体間の情報伝達を司り、種の維持など生活の様々な行動を化学的に制御している。フェロモン研究は、動物とりわけ昆虫の発生密度を農薬に替わって制御できる可能性が考えられたことから、生物学者のみならず天然物化学者からも注目され、機器分析法の発展とともに飛躍的に発達してきた。フェロモンのなかでも特に配偶行動を制御するフェロモンを性フェロモンと呼び、Butenandt らによってカイコガの性フェロモンの化学構造が決定されて以来、現在まで昆虫だけでなくダニ類、哺乳類などさまざまな動物の性フェロモンが解明され、生物界に広く分布することがわかっている^{1, 2)}。

ダニ類においては、動物寄生性のマダニ類、植物寄生性のハダニ類の性フェロモンが研究され、その性フェロモンのシステムが明かにされている^{3, 4)}。本研究で取り上げる無気門亜目コナダニ類においては、Boczek と Griffiths が、アシプトコナダニ *Acarus siro* とコオノホシカダニ *Lardoglyphus kono* の配偶行動を観察し、雄が分泌して雌を誘引するフェロモン（雄分泌性の性フェロモン）と、雌が分泌して雄に性的興奮を起こさせるフェロモン（雌分泌性の性フェロモン）の存在を示唆している⁵⁾。さらに Levinson らによりこの2種類の性フェロモンの生物学的な存在がアシプトコナダニ *Acarus siro* を用いて証明された。しかし、その活性化合物の同定はなされていない⁶⁾。一方、ゴミコナダニの1種 *Caloglyphus polyphillae* で β -acaridial [2(E)-(4-methy-3-pentenylidene)-butanedial] が⁷⁾、ムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus* で 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde が⁸⁾、雄に交尾行動を解発する雌分泌性の性フェロモンとして同定されている。この2種のダニの雌分泌性の性フェロモンは雌だけでなく雄にもほぼ同量存在していることが分かっている。このよう

に、コナダニ類は昆虫や他のダニ類とはまったく異なる性フェロモンのシステムを持つものと予想された。

そこで本研究では、前述のアシプトコナダニ *Acarus siro* の同属種であるオソアシプトコナダニ *Acarus immobilis* を用いて、同様に雄分泌性の性フェロモンと雌分泌性の性フェロモンが存在すると考え、それぞれの活性化合物の同定を行い、その性フェロモンのシステムの解明を試みた。

まず、飼育培地から分離したオソアシプトコナダニ *Acarus immobilis* をヘキサンで抽出した。予備試験として、その抽出物を予め分離しておいた雄、雌にそれぞれ与えてみた。すると、雄は激しく雄同士で背中に乗りあう行動を示し、雌は試料に誘引されることが判明した。そこで、この顕著な行動を指標とした生物試験法を確立し、性フェロモンの活性をモニターしながら、雄雌2種類の性フェロモンの精製を行った。得られた活性化合物は機器分析

(GC/MS, NMR, GC/FT-IR) を行い、構造を決定した。構造決定した性フェロモン活性化合物を合成して同定し、それらの生物活性を確認した。その結果、両性に存在するものの、雄のみに性的興奮を解発する雌分泌性の性フェロモンとして 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde を、雌を誘引する雄分泌性の性フェロモンとして、炭素数 13 から 29 の直鎖飽和、不飽和炭化水素の混合物を同定した⁹⁾。この雄分泌性の性フェロモンの活性発現には、雄のみが持つ成分と両性が持つ成分の両方が必須であることも明らかにした。これらの結果について以下に詳述する。

2. 材料および方法

(1) 供試ダニの飼育法

オソアシブトコナダニ *Acarus immobilis* GRIFFITHS [Acari: Acaridae] の飼育には、ガラス製の蓋（直径 11.5cm で中心に直径 3cm の通気孔が開いている）のあるガラス製の円筒容器（内径 11cm, 高さ 7cm）を用いた。ダニが飼育容器外へ逃げるのを防ぐため、蓋の通気孔には紙を貼った。飼料として乾燥酵母と全粒小麦粉の等量混合物を、以下にのべるように、容器内のダニの密度や成長に応じて 3 日から 1 週間の間隔で適量与えた。なお、飼育容器は飽和 KCl 水溶液を深さ 1–2cm 入れた密閉容器の中に入れ、容器内の湿度を約 80% に保つように調整した。さらに、この密閉容器は 25℃ に調節された 24 時間暗条件の昆虫飼育室の中に置いた。

容器内のダニが深さ 1–3cm となり、飼料がほとんどない状態、換言すれば飽和状態になっている容器からダニを含む飼育培地を葉さじ 1 杯分程度取りだし、新しい飼育容器に移す。これに飼料を葉さじ半杯（約 0.3g）与えた。その後は、餌の過不足に注意しながら 3–4 日の間隔で 1 回 0.3g 程度の餌を与えて飼育した。一度に多量の餌を与えると、ダニは死滅してしまう。これは餌が水分を吸収して飼育容器内の湿度が下がり、乾燥するためと考えられる。容器内のダニの数が少ないうちは、特に餌のやりすぎに注意することが肝要である。約 3 ヶ月飼育すると、飼育培地の表面はダニで飽和状態になる。飽和状態のダニは次節で述べる方法で虫体だけを分離し、性フェロモンの抽出を行った。必要に応じて飼育容器の数を増やし、大量飼育した。1 つの飼育容器で 2–3g のダニを飼育することできた。

(2) 抽出法

飽和食塩水浮遊法¹⁰⁾を改良し以下の方法で、生きているダニ虫体だけを飼育培地より分離して集めた。飼育培地を三角フラスコに移し、飽和食塩水を加えて、完全に均一に分散させながら分液ロートに移す。そのまま静置する

と生きているダニ虫体は表面に浮き、餌と死骸は水層および底へ沈むので下層部分（水層および沈澱）を捨てる。飽和食塩水を加え、分離するこの操作を、下層が透明になるまで繰り返したあと、ダニ虫体を含む上層をプフナーロートで吸引ろ過し、生きているダニ虫体のみを集めた。集めたダニは十分に水洗し、吸引を続ける。十分に吸引すると、風乾してダニが動きだす。そこで、ダニの虫体重を測定したのちヘキサンに3分間浸漬して、活性抽出物を得る。抽出には虫体 5g に対して約10mlのヘキサンを用いた。このヘキサン抽出液を、脱脂綿を詰めたロートでろ過し、ダニ虫体を除いた。抽出液を減圧下で濃縮し、得られた粗抽出物を用いて性フェロモンの精製、構造決定および生物試験を行った。

雄、雌、若虫の後胴体部腺分泌物の成分および体表の成分の比較は、以下のように小スケールの抽出法を用いて行った。雄、雌、若虫それぞれ数百頭づつをミクロのサンプル管(ガラス製、外径 8mm × 長さ 50mm) へ針の先に乗せて取り、そこへ 100 μ l のヘキサンを加えた。3分間浸漬したのちマイクロシリンジを使って、先を円錐形に細くした別のミクロのサンプル管へ移した。その抽出液を約 1 μ l に弱い窒素气流をあて濃縮し、その全量をガスクロマトグラフィー分析に供した。

(3) 生物試験法

生物試験は図1のようなガラス製の容器を考案して行った。この試験容器はガラス管の両端を細くした形になっており、中心部で2つに分離できるようになっている（全長 80mm、接続部の外径 15mm、両端の細くなっている部分 外径 4mm × 長さ15mm）。飼育培地から取ったダニ約20頭を木綿針の先に乗せて集め、試験容器の中に移した。試験容器には予め水で溶いた餌（乾燥酵母）を内壁に直径 約 5mm の円状として付けておく。ダニが容器外へ逃げるの防ぐため、試験容器の両端は脱脂綿で栓をした。飽和 KCl 水溶液を底 1-2cm の高さで入れた密閉容器内に台を作り、試験容器が濡れないように工夫して、その台の上に置いた。3日間条件づけのために放置し、ダニが餌の上に静止

した状態の時に生物試験を開始した。試料は先が球状になったガラス棒 (棒部の直径 0.2mm, 長さ 5cm, 先端部の直径 1mm) の先端部にヘキサシランで十倍毎に希釈して塗布した。試料 $1\mu\text{l}$ を球状の先端部にマイクロシリンジで付け、ダニを驚かさないうにガラス棒を試験容器の一方の端から、餌から 5mm 離れた位置に先端部がくるように挿入する。その後、ダニの行動変化を 5 分間実体顕微鏡下で観察する。この試験は 1 試料につき 3-6 回繰返し行った。雌分泌性の性フェロモンの場合には、条件づけして静止していた雄が動き始めて、他の個体に乗るような行動 (以後マウント行動と呼ぶ) を平均 80% 以上の個体が示した時、活性ありと判断した。雄分泌性の性フェロモンの場合には、条件づけした雌がガラス棒の先端部に個体数として平均 50% 以上誘引され、先端部に乗る行動を示した時に、活性ありと判断した。

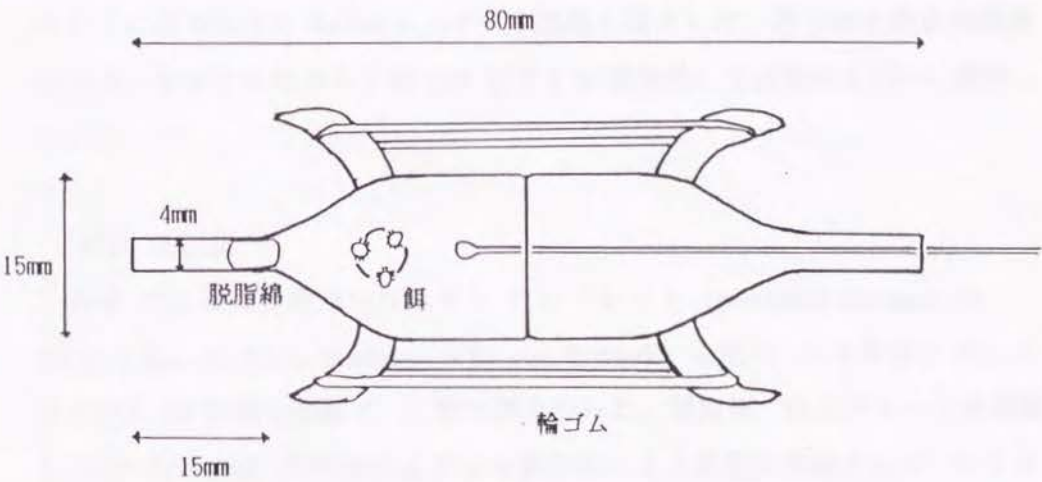


図 1 生物試験装置

(4) 性フェロモンの精製・分析に用いた分析法および使用機器

・カラム・クロマトグラフ法

カラム・クロマトグラフ法にはシリカゲル(WACOGEL C-200, 和光純薬 KK)を充填剤として用い、常法に従ってヘキサンでスラリーとして充填した。用いたシリカゲルの重量は分析する試料の重さの10倍を基本とした。展開溶媒にはヘキサン、ヘキサン：エーテルの混液、エーテルを用い、段階的溶出法で順次溶出した。各展開溶媒の量はシリカゲルの重量を $g = ml$ と仮定して、常にその10倍量を用いることとした。充填するシリカゲルの量が500mg以下のときは市販のバスツールピペット(岩城硝子社製, 内径6mm×全長13cm)をカラムとして用いた。

炭化水素の精製に用いた硝酸銀10%含有シリカゲルは以下の方法で調製した。シリカゲルに対して10%の重量の硝酸銀を、蒸留水で予め洗ったナスフラスコに秤り取った。硝酸銀を少量の蒸留水で溶かし、ついで大量のエタノールで希釈した。この溶液に計算量のシリカゲルを少しずつ加え、均一になるように振り混ぜてエバポレーターで溶媒を留去した。得られた粉状の硝酸銀含有シリカゲルはさらに約120℃で2時間加熱して活性化を行い、使用した。

・分取 TLC 法

分取 TLC 法は分析用シリカゲル TLC プレート (precoated silicagel 60 HF254, 5cm×25cm, thickness 0.25 mm, E. Merk) を用い、ヘキサン：エーテル(100：3)の混合溶媒で、二重展開を行った。展開後、TLC プレートを風乾し、UV (254nm) の照射およびヨウ素蒸気による発色を目安として、シリカゲルをスパテルで注意深くかき取って集めた。集めたシリカゲルは脱脂綿の小球で栓をした市販のバスツール・ピペット (岩城硝子社製, 内径6mm×全長130mm) へ移し、ヘキサン：エーテル(100：3)の混合溶媒5mlで溶出し、回収した。溶出液は減圧下に溶媒を留去し、精製物質とした。

・ガスクロマトグラフ法

性フェロモンの分析には以下の2台のガスクロマトグラフを以下の運転条件に設定して使用した。1. HITACHI 263-30 型 ガスクロマトグラフには CP-Sil 19CB キャピラリー・カラム (0.22mm × 25m, Chrompack)を装備し, 135℃ から 250℃まで毎分 4℃で昇温させる昇温分析法で分析を行った。注入口および検出器の温度は 240℃に設定した。2. YANACO G-180F 型 ガスクロマトグラフには FFAP キャピラリー・カラム (0.25mm × 25m, Quadrex) を装備し, 130℃ 一定条件で分析を行った。注入口および検出器の温度は150℃ に設定した。試料の注入には, 共にスプリット方式 (分割比 100: 1) を用いた。検出器は, 共に水素炎イオン化検出器を用いた。クロマトグラムはインテグレーター (SIC 社製 7000A) で出力をし, 組成比および保持時間を記録した。合成過程の化合物の分析には, 充填カラムを装備した YANACO G-180F 型 ガスクロマトグラフを使用した。充填カラムとして 2% OV-1 (担体: Chromosorb W-AW, 80-100 mesh, 3mm × 1m) と 20% FFAP (担体: Chromosorb W-AW, 80-100 mesh, 3mm × 1m)を用いた。検出器として水素炎イオン化検出器を用いた。クロマトグラムはインテグレーター (SIC 社製 7000A) で出力をし, 組成比および保持時間を記録した。保持時間は溶媒の保持時間を 0 分とする修正保持時間 (t_R') として表した。

・ガスクロマトグラフ分取法

Ohkura 802 型 ガスクロマトグラフを用いて以下の運転条件で分取を行った。カラムは内径 4mm × 長さ1m のステンレス製のものを使用し, 充填剤は 20% FFAP (担体: Chromosorb W-AW, 80-100 mesh) を用いた。オープン内温度は120℃ 一定, 注入口は 200℃ に設定し, 検出器は熱伝導率型検出器 (TCD) を用いた。25 - 50 μ l の試料を 1 回に注入し, カラム出口からの留出物を内径 2mm, 外径 4mm, 全長 15cm のガラス製 U 字管に導いた。U 字管は氷浴で冷却し, 内部に捕集された物質は, 約 2ml のヘキサンで溶出した。

・質量分析法

HITACHI M-80B 高分解能ガスクロ質量分析装置を用い、試料をガスクロ導入して電子衝撃イオン化法 (70eV) により、低分解能モードで分析した。カラムは Al-Clad fused silica methylsilicone キャピラリー・カラム (0.22mm × 25m, Quadrex)を用い、キャリアーガスはヘリウム、流量は 30ml/min とした。135℃から 250℃まで毎分 4℃で昇温させる昇温分析法で分析を行った。注入口、検出器および GC-MS インターフェース部分の温度は 250℃ とした。

・核磁気共鳴吸収スペクトル分析法

筑波大学分析センターの日本電子株式会社製 JEOL FX-100 核磁気共鳴吸収スペクトル装置 ($^1\text{H-NMR}$: 100MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 25.2MHz) および Bruker 社製 AM-500核磁気共鳴吸収スペクトル装置($^1\text{H-NMR}$: 500MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 125.7MHz) を用いる委託分析により測定した。試料の調製は常法により、以下のように行った。試料の溶媒を減圧下あるいは窒素気流で留去する。残留している少量の溶媒を除去するため CCl_4 を加え再度留去し、重クロロホルム CDCl_3 に転溶して、試料管 (外径 5mm × 長さ 18cm) に移す。試料が微量の場合には 1% TMS を含む CDCl_3 1 滴を試料溶液に加える方法で、合成化合物など多量の試料が用意できる場合には CDCl_3 のかわりに 1% テトラメチルシラン(TMS) を含む CDCl_3 で試料を溶解する方法で、TMS を内部標準として測定した。測定温度は JEOL FX-100 は室温, Bruker AM-500 は 30℃ とした。得られた化学シフトのカップリングパターンは s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet) と省略して記載した。

・赤外吸収スペクトル分析法

日本分光株式会社製 IRA-1 型赤外線分光光度計を用い、常法により NaCl セルを用いた液膜法で測定した。GC/FT-IR は島津製作所製 4300型を用いた。

カラムは CBP1-W-25-300ワイド・ボア・キャピラリー・カラム (0.53mm × 25m, Shimadzu)を用い, 100℃から250℃まで毎分10℃で昇温させ, 分析を行った。GC と IR のインターフェースの温度は180℃とした。

(5) 二重結合位置の決定法^{11, 12)}

試料のヘキサン溶液を 10ml 容のリアクチバイアル (Wheaton 社製) に移し, 窒素気流によってヘキサンを除いた。dimethyldisulfide (DMDS) 0.2ml に転溶し, 微量のヨウ素を反応液が褐色になるまで加え, 60℃に加温しながら, 約 12 時間攪拌した。反応終了後, チオ硫酸ナトリウムの 2% 水溶液を加えヨウ素を脱色した。ヘキサンを加え, バイアル内で分液操作を行い, 反応物をヘキサン抽出した。抽出液は Na_2SO_4 で乾燥し, 適当な濃度に希釈したのち, GC/MS 分析に供した。

(6) ガスクロマトグラフィーを用いた性フェロモンの定量

雄, 雌, および若虫のヘキサン抽出液中に含まれる性フェロモン成分の定量は, 絶対検量線法で行った。市販, あるいは合成により調製した標品をヘキサンで希釈し, 1, 10, 100, 1000ppm の各標準溶液を調製した。各標準溶液 1 μl をそれぞれ 3 回ずつガスクロマトグラフに注入し, 平均のピーク面積と試料の注入量とをプロットして検量線を作成した。

雄と雌をそれぞれ 100頭, 若虫は 200頭をマイクロサンプル管(ガラス製 外径 8mm × 長さ 50mm)へ針の先に乗せて取り, そこへ 100 μl のヘキサンを加えた。3 分間後, マイクロシリンジを使って抽出液を抜き取り, 先を円錐形に細くした別のマイクロサンプル管へ移した。その抽出液をさらに約 1 μl に弱い窒素気流をあてて濃縮し, その全量をガスクロマトグラフに注入した。この操作を 3 回繰返し, 得られた試料の平均ピーク面積を検量線に当てはめ, 1 頭あたりの性フェロモン成分の量の平均値を計算し, 標準偏差を算出した。ガスクロマトグラフには HP 5980 series II 型ガスクロマトグラフを使用し, スプリット方式 (分割比 100:1) により注入した。カラムは CP-Sil 19CB キ

キャピラリー・カラム (0.22mm × 25m, Chrompack), 135℃から 250℃まで毎分 4℃で昇温させる昇温分析法で分析を行った。注入口および検出器の温度は 240℃に設定し、検出器は水素炎イオン化検出器を用いた。ピーク面積の積算はインテグレーター (HP 2800) により行った。

3. 性フェロモンの同定

(1) 粗抽出物での予備試験

I. 2. (2) で述べた方法によりオソアシプトコナダニ虫体 20.7g をヘキサンで抽出し、粗抽出物 76mg を得た。得られた粗抽出物がこのダニの雄と雌にどのような行動を引き起こすか調べるため、I. 2. (3) に述べた方法で予備的な生物試験を行った。

雄だけの集団として分離しておいた雄に対して粗抽出物を投与すると、餌の上で静止していた雄は動き出し、雄同士で背中に乗りあう行動を示した。この行動は100ng と1 μ gの投与で特に激しく観察された。以後、このマウント行動を指標として雌分泌性の性フェロモンの探索を行った（詳細はI. 3. (2) に述べる）。なお、10 μ gの投与では雄は忌避行動を示した。

雌に対して粗抽出物を投与すると、1 μ gの投与量で試料を塗布したガラス球に集まり、激しくそのまわりを動き回る行動を示した。以後、この顕著な誘引活性を指標として雄分泌性の性フェロモンの探索を行うこととした（詳細はI. 3. (3) に述べる）。なお、10ng、100ngの投与量では雌は反応を示さず、また10 μ gの投与では容器内を動き回るが、ガラス球には集まる傾向はなかった。

(2) 雌分泌性の性フェロモンの同定

(a) 雌分泌性の性フェロモンの精製と各画分の生物試験結果

ヘキサン粗抽出物を図2に示すようにヘキサン・エーテル混液を溶出溶媒としたシリカゲル・カラム・クロマトグラフ法で段階的に溶出し、各溶出部の性フェロモン活性をマウント行動を指標としてモニターした。その生物試験結果は表1に示す。粗抽出物にみられたマウント活性は3% エーテル含有ヘキサン溶出部 (E/H 3% 画分) にのみ認められた。その活性は10ngの投与量まで認められ (73.8%)、100ng、1 μ gの投与量では激しく雄同士が乗り

あう行動が観察され、反応率はそれぞれ 82.9%, 84.5%であった。E/H 3% 画分を $10\mu\text{g}$ の投与量で試験すると粗抽出物の予備試験のときに見られた忌避行動が、すべての個体に観察された。

マウント活性を示した E/H 3% 画分のガスクロマトグラムを図3に示す(測定条件: CP-Sil 19CB, $135-250^{\circ}\text{C}$, $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$)。その結果、この活性画分には A (86.2%, t_R 1.83 min), B (6.0%, t_R 5.84 min), C (2.2%, t_R 9.60 min), および D (5.6%, t_R 30.74 min) の4成分を含むことが明らかになった。高沸点の化合物 Dは保持時間の比較から飼料由来のスクワレンと同定された。

さらに、シリカゲル分取 TLC 法を用いてこの活性画分の精製を行った(図2)。その結果、 R_f 0.23-0.34 に強い UV 吸収、0.47-0.68 に弱い UV 吸収のあるバンドが検出された。この2つの UV 吸収バンドを目安として、 R_f 0.00-0.23, 0.23-0.34, 0.34-0.47, 0.47-0.68, 0.68-1.00 のバンドをかきとってエーテル抽出し、それぞれ画分 I (1mg), II (5mg), III (3mg), IV (3mg), および V (0.4mg) を得た。得られた画分の組成をガスクロマトグラフィーにより調べた結果、A は画分 II に単離され、B, C は画分 III に回収された。その他のバンドを抽出して得た画分からはガスクロマトグラフィーの保持時間が 15 分以内の揮発性物質のピークは認められなかったため、この2画分の性フェロモン活性を調べた(結果は図4, 5に示す)。 R_f 0.47-0.68 の弱い UV 吸収バンドは微量の不揮発成分によるものと考えられた。

画分 II の化合物 A は投与量 100ng と $1\mu\text{g}$ でそれぞれ 69.5% と 72.3% の雄がマウント活性を示し、雄に特異的なマウント行動を起こさせる雌分泌性の性フェロモンであることが判明した(図4)。画分 III の化合物 B, C は、A との存在比を考慮して、0.1, 1, および 10ng の投与量で生物試験を行った。その結果、いずれの投与量でも 10% 以上のマウント活性は示さなかった(図5)。しかし、試料を投与したダニは静止しておらず、10ng の投与量では半分以上の雄が試験容器内を動き回る行動を示した。そこで、画分 III に画分 II に対する共力作用がある可能性を考え、天然成分比と同じ割合 (10:1) になるように画分 II と画分 III を混合し、1.1, 11, および 110ng の投与量で生物試験

を行った（図6）。しかし、投与量 1.1ng で反応率 5.6%, 11ng で 29.8%, 110ng で 66.4%と、画分Ⅱ の試験結果と比較して顕著な活性の増加は認められなかった。

画分Ⅱ（A）と精製前の E/H 3% 画分の活性を比較すると、低投与量（10ng）での活性が低下している。この活性の低下は画分Ⅲ（化合物 B, C）を加えることでは改善されなかった。本研究で検討を行わなかった画分中に化合物 A に対する共力作用を持つ微量成分が存在する可能性も考えられる。また、高沸点化合物（飼料由来のスクワレンやトリアシルグリセロールなど）が精製の過程で除かれたため、試料の蒸発速度が速くなり、活性の見かけの強さが変化した可能性も考えられる。

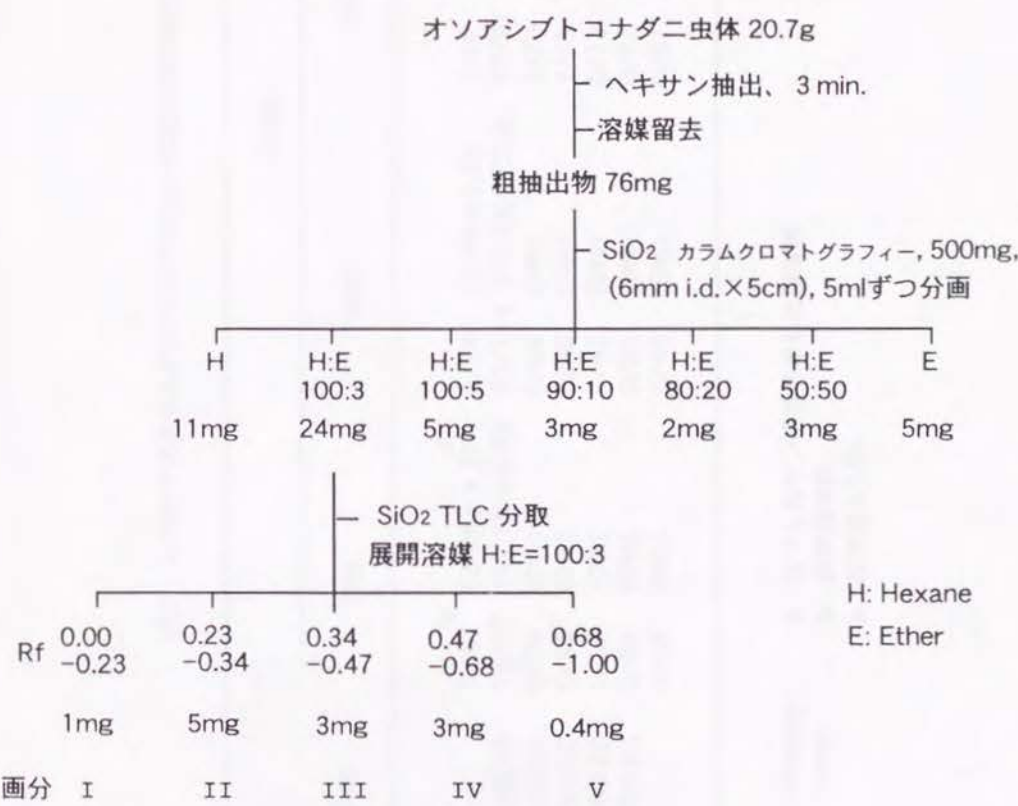


図2 雌分泌性の性フェロモン精製法

表1 シリカゲルカラムクロマトグラフィー溶出画分の雌分泌性の性フェロモン活性

Fraction	DOSE			
	1ng	10ng	100ng	1 μ g
H	a ^a b ^b c ^c 2/63 (2.5% \pm 4.3)	3/54 (5.4% \pm 5.5)	2/60 (2.6% \pm 4.6)	7/53 (13.3% \pm 2.4)
H:E=100:3	18/97 (17.4% \pm 9.9)	83/114 (73.8% \pm 23.8)	80/97 (82.9% \pm 9.2)	90/107 (84.5% \pm 12.9)
H:E=100:5	0/74 (0%)	0/66 (0%)	3/70 (4.8% \pm 8.2)	4/47 (8.4% \pm 7.3)
H:E=90:10	0/58 (0%)	0/65 (0%)	1/65 (0.5% \pm 0.9)	0/55 (0%)
H:E=80:20	0/52 (0%)	0/42 (0%)	0/73 (0%)	1/36 (2.7% \pm 4.8)
H:E=50:50	0/63 (0%)	0/55 (0%)	0/72 (0%)	2/67 (3.6% \pm 3.6)
E	0/62 (0%)	0/46 (0%)	0/81 (0%)	0/67 (0%)

H : Hexane
E : Ether

a : 性フェロモン活性を示した個体数
b : 供試個体数
c : 反応率 \pm S.D.

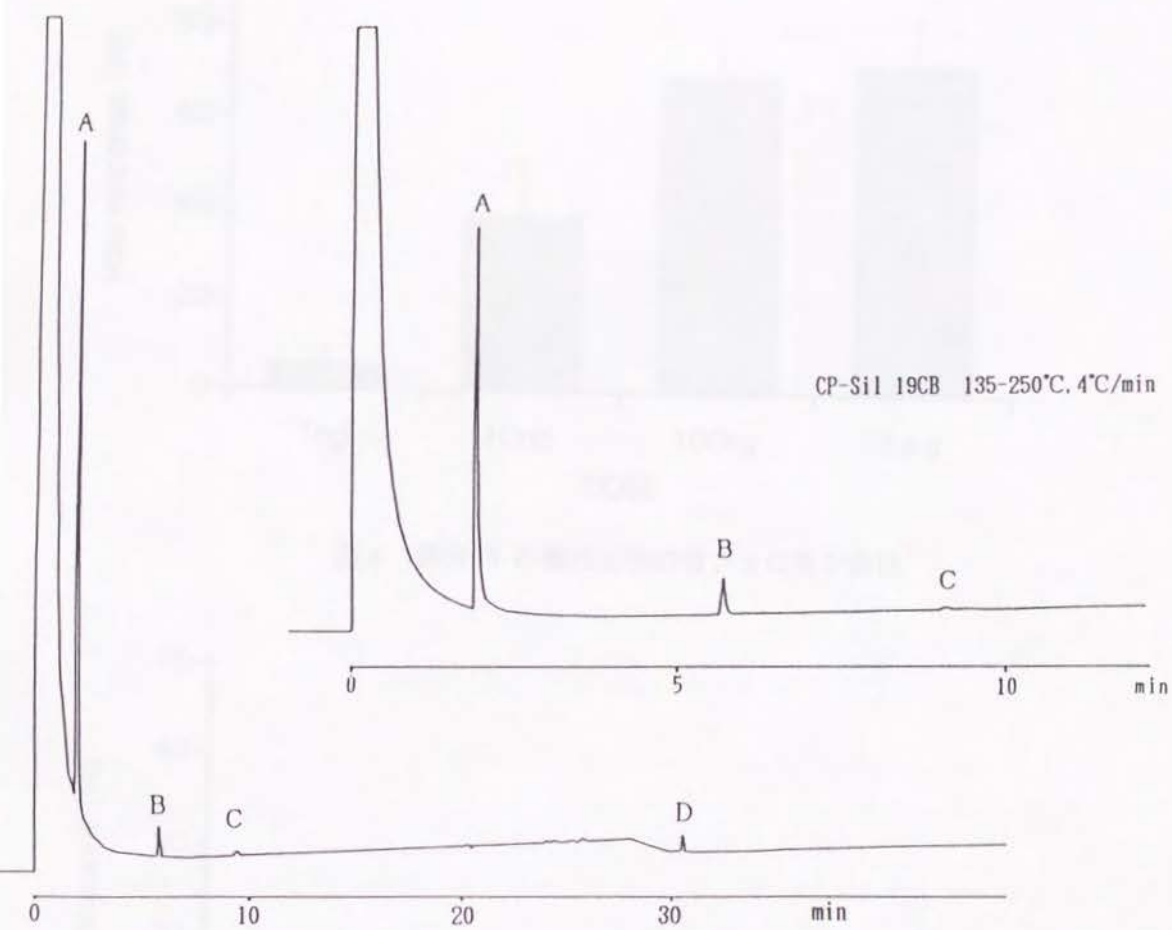


図3 雌分泌性の性フェロモン活性画分のガスクロマトグラム

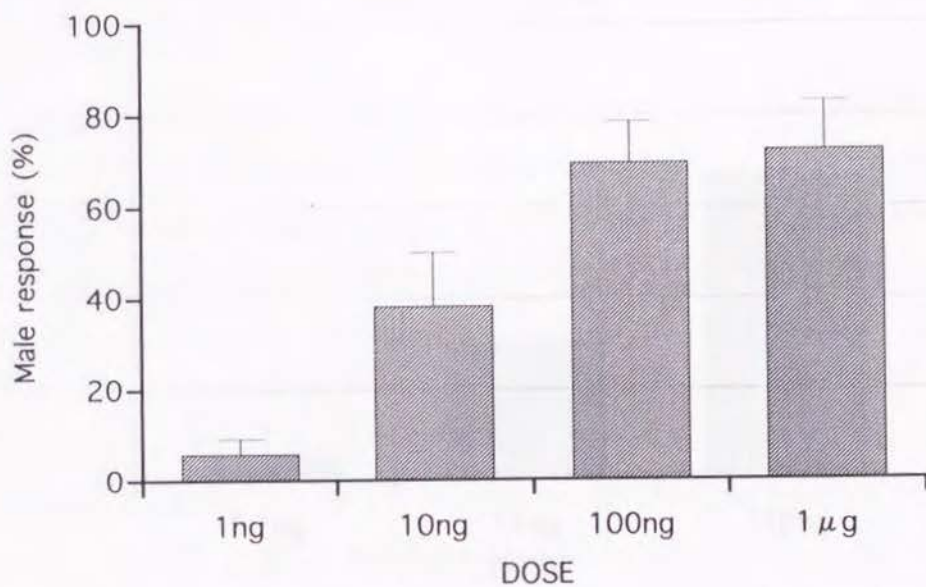


図4 画分Ⅱの雌分泌性の性フェロモン活性

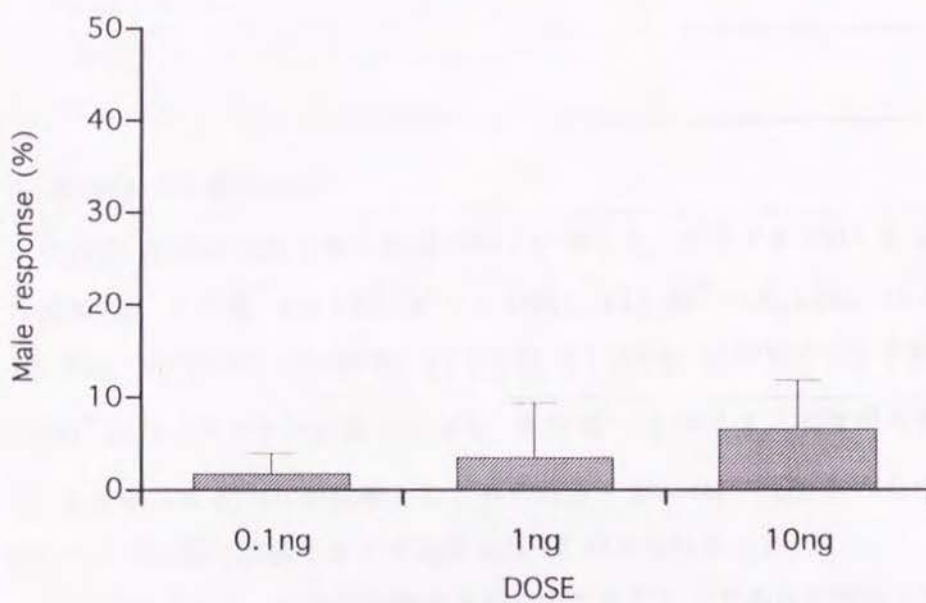


図5 画分Ⅲの雌分泌性の性フェロモン活性

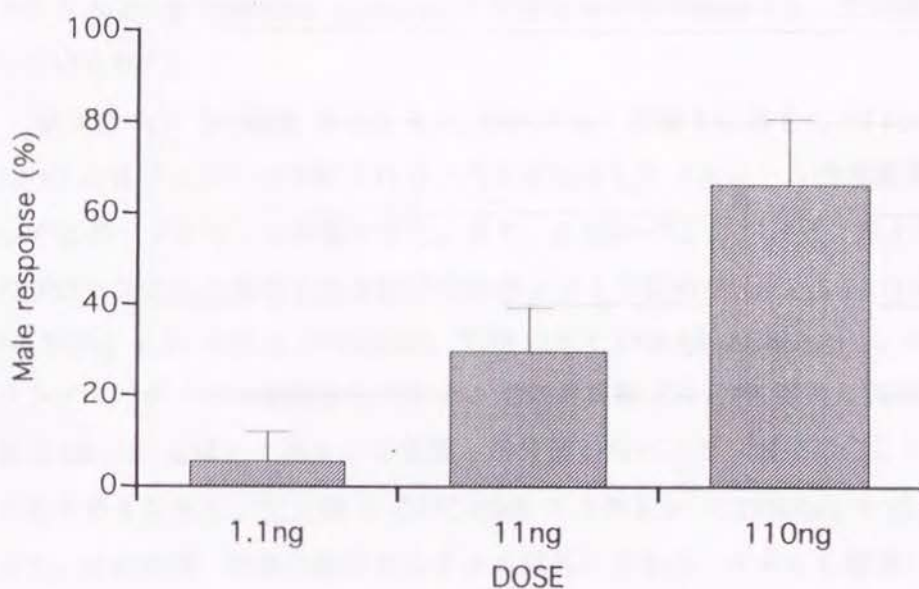


図6 画分 II, III 混合物の雌分泌性の性フェロモン活性

(b) 化合物 A の構造決定

化合物 A の GC/MS 分析の結果を図 7 に示した。分子イオン M^+ を m/z 136 (100%) に、その他、 m/z 135 ($M^+ - 1$, 96%), 118 ($M^+ - 18$, 12%), 107 ($M^+ - 28$, 8%), 90 (31%), 79 (30%), 77 (35%), 51 (26%) に開裂イオンを観測した。

- (1) M^+ がベースイオンになっており、また $M^+ - 1$ のイオン強度が大きい。
- (2) カルボニル ($C=O$) が脱離したとみられるイオン ($M^+ - 28$) がみられること。
- (3) ベンゼン環の診断イオンである m/z 77 がみられること。

以上の3点から、この化合物は芳香族のアルデヒドであると推定した。

化合物 A の GC/FT-IR スペクトルを図 8 に示す。 $C=O$ 伸縮振動が

1666 cm^{-1} に観測されることから、サリチルアルデヒドのような、フェノール性水酸基と分子内水素結合したアルデヒドを推定した。2800 cm^{-1} のアルデヒドの C-H 伸縮振動、1454 cm^{-1} の芳香環の環伸縮からも、推定構造がうらづけられた。

化合物 A の ^1H -NMR スペクトル (500MHz) を図 9 に示す。 δ 11.90 と 10.33 の化学シフトはそれぞれ分子内水素結合したフェノール性水酸基とアルデヒド・プロトンと帰属できた。また、 δ 6.5–7.5 にベンゼン環上の3個のプロトン由来と推定される以下の化学シフトを認めた [δ 6.71 (1H, d, $J=7.38\text{Hz}$), 6.81 (1H, d, $J=8.48\text{Hz}$), 7.38 (1H, t, $J=8.48, 7.38\text{Hz}$)]。カップリング・パターンの解析からベンゼン環の置換様式は1,2,3置換と判明した。 δ 2.64 (3H, s) はケミカルシフト値と積分値からベンゼン環に結合したメチル基と考えられた。化合物 A の ^{13}C -NMR スペクトル (125MHz) を図 10 に示す。その結果、溶媒の由来のシグナル以外に8本のシグナルを観測した。195.34 ppm はベンズアルベヒドのカルボニル炭素、163.25, 142.13, 137.44, 121.63, 116.60, 116.15 ppm の6本のシグナルは芳香環由来、18.10ppm はベンゼン環に結合したメチル基と帰属できた。以上の結果を考慮し、化合物 A の構造を 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde (以下 2,6-HMBD と省略) と推定した。

2,6-HMBD を合成し(合成方法は I. 4. (1) 参照)、化合物 A と GC/MS, GC/FT-IR, ^1H -NMR (500MHz), ^{13}C -NMR (125MHz) とのスペクトルの比較を行った。その結果、すべて一致したので化合物 A は 2,6-HMBD と同定できた。各シグナルの帰属は実測値と計算値を比較して行った(図11) ¹³⁾。

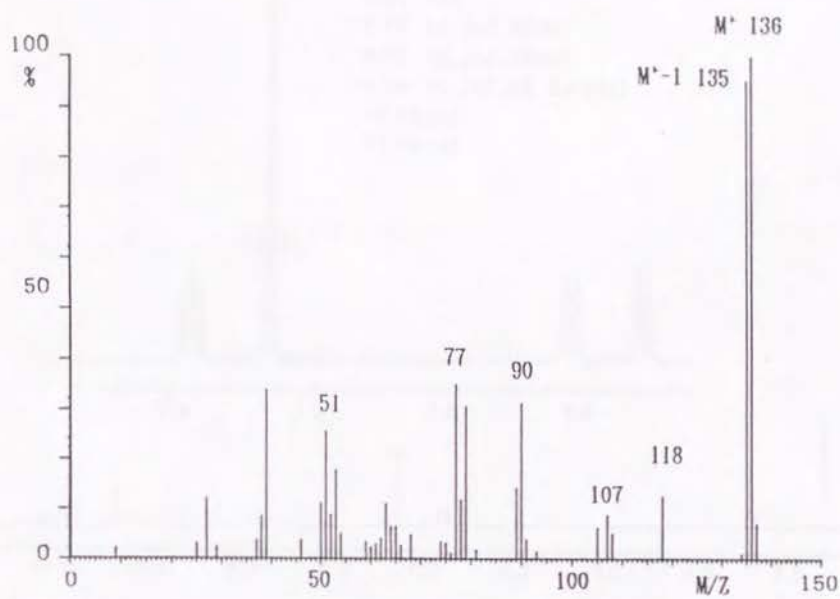


図 7 Aのマススペクトル

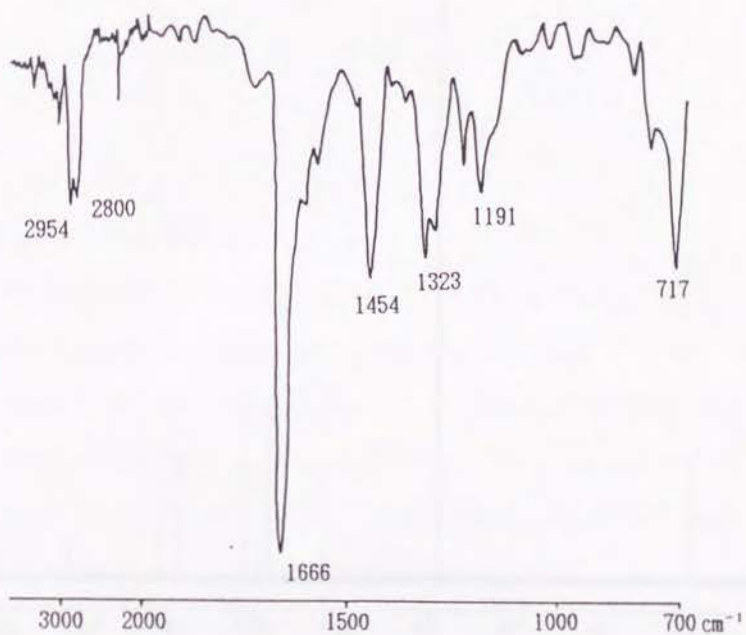


図 8 AのGC-FTIRスペクトル

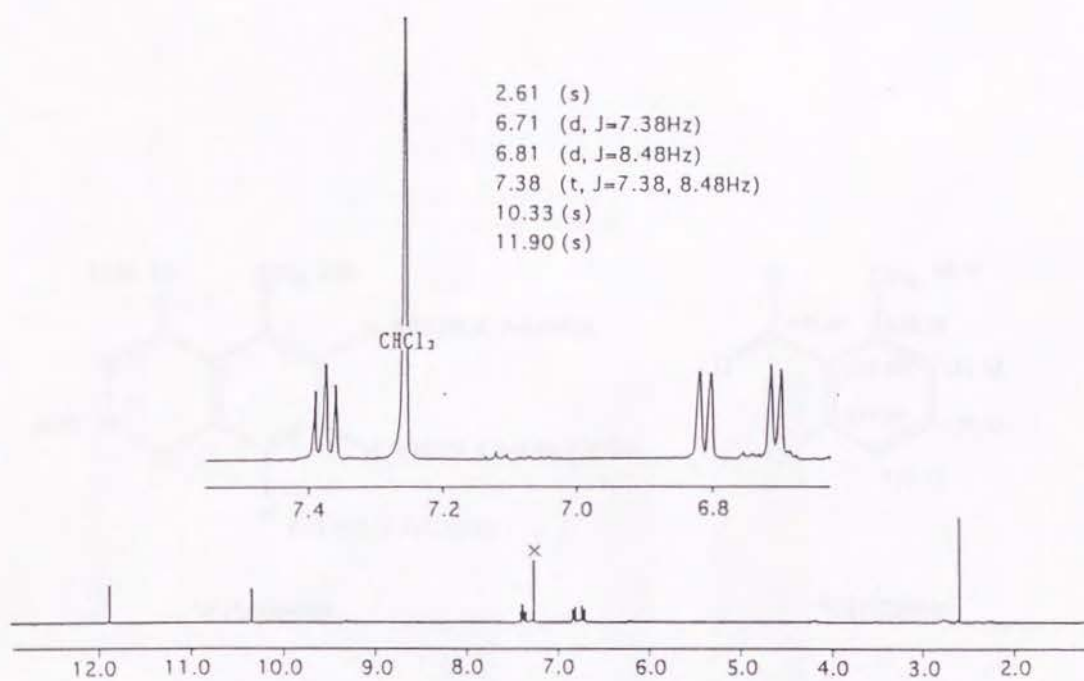


図9 Aの¹H-NMRスペクトル (500MHz, CDCl₃)

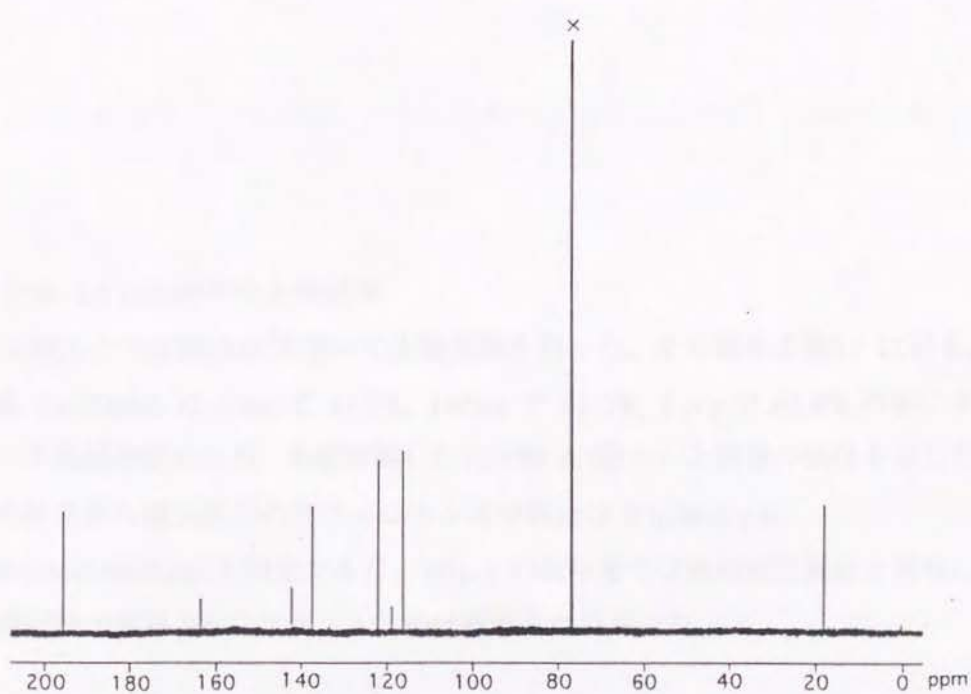


図10 Aの¹³C-NMRスペクトル (125MHz, CDCl₃)

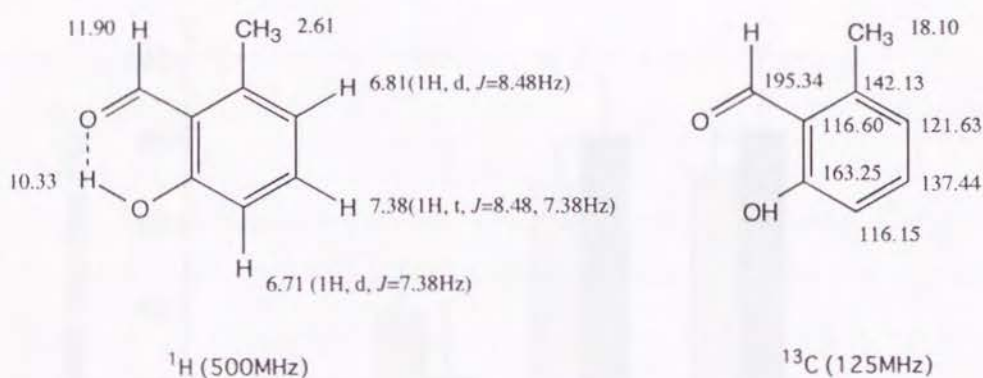


図11 2-hydroxy-6-methylbenzaldehydeのNMRスペクトルの帰属

(c) 合成 2,6-HIMBDでの生物試験

合成した 2,6-HIMBD を用いて生物試験を行った。その結果を図12 に示す。合成 2,6-HIMBD は 10ng で 22.2%, 100ng で 81.0%, $1\mu\text{g}$ で 81.8% の雄にマウント活性が認められ、単離精製した化合物 A (図4) と同様の活性を示した。この結果から雌分泌性の性フェロモン A の構造は 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde と同定できた。 $10\mu\text{g}$ の投与量では他の活性画分と同様に忌避行動が観察され、マウント行動は認められなかった。

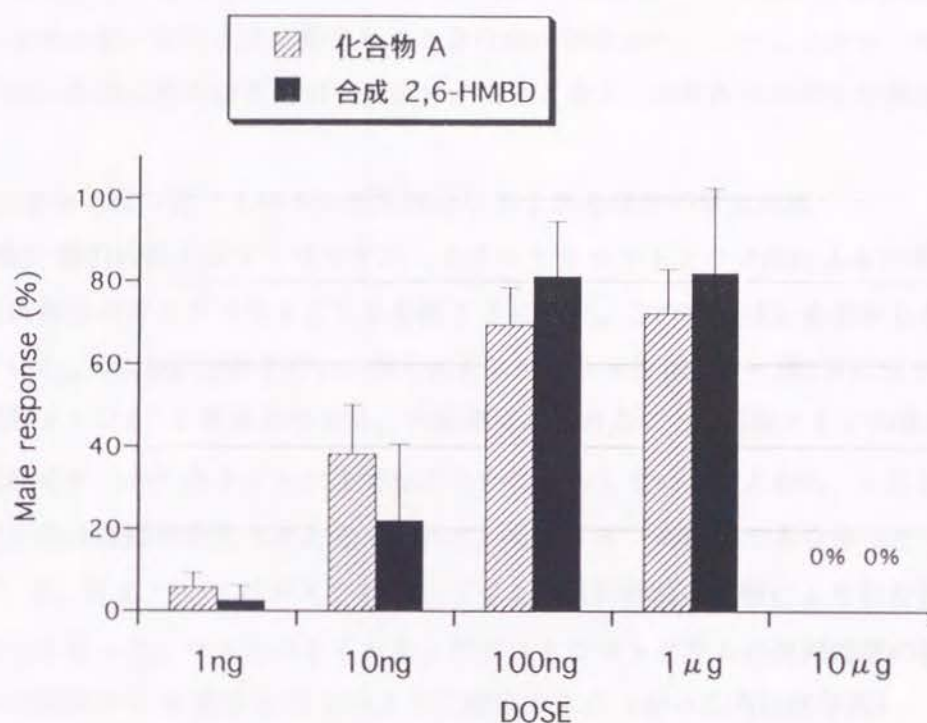


図12 化合物 A と合成2,6-HMBDとの雌分泌性の性フェロモン活性の比較

(3) 雄分泌性の性フェロモンの同定

(a) 雄分泌性の性フェロモンの精製と各画分の生物試験

前節で述べたシリカゲル・カラム・クロマトグラフィーによる7画分（図2）の誘引活性をモニターした。生物試験結果を表2に示す。

雌に対する誘引活性はヘキサン溶出画分にのみ認められた。特にヘキサン溶出画分を $1\mu\text{g}$ を投与すると 52.5% の雌が試料を付けたガラス玉に誘引された。 $10\mu\text{g}$ を投与すると、粗抽出物を試験したときと同様に、容器内を動き

回るが試料を塗布したガラス玉への誘引性は認められなかった。ヘキサン溶出画分を雄に対して試験すると $1\mu\text{g}$ の投与で静止していた個体が動きだすことはあるが、ガラス球に集まるような行動は示さない。このことからヘキサン溶出画分に雌だけを誘引する成分があると考え、活性成分の同定を試みた。

(b) 雄分泌性の性フェロモン活性画分に含まれる成分の構造決定

雌に誘引活性を示すシリカゲル・カラム・クロマトグラフ法によるヘキサン溶出画分のガスクロマトグラムを図13に示す。この画分は8成分からなっていた。GC/MS分析を行い、得られたスペクトルを図14－図18に示す。開裂イオンが14質量単位(CH_2)の間隔で見られること、開裂イオンの強度が基準イオンから分子イオンまでなだらかに減少していることから、これらの化合物は直鎖の炭化水素と考えられた。分子イオンの観測できなかったC、F、G、Hについてはガスクロマトグラムの保持時間の比較により化合物の同定を行った。マスマスペクトルおよびガスクロマトグラムの保持時間の標品との比較から8成分は以下のように同定できた(カッコ内は成分比)。

	保持時間	
	CP-Sil 19CB	FFAP
A : tridecane (60.8%)	1.35 分	0.87分
B : pentadecane (5.7%)	3.13 分	2.58分
C : heptadecane (1.7%)	6.21 分	7.65分
D : heptadecene (6.8%)	6.06 分	7.98分
E : heptadecadiene (13.5%)	6.06 分	9.71分
F : pentacosane (1.6%)	22.98 分	—
G : heptacosane (6.3%)	26.84 分	—
H : nonacosane (3.5%)	30.97 分	—

表2 シリカゲルカラムクロマトグラフィー溶出画分の雄分泌性の性フェロモン活性

Fraction	DOSE			
	10ng	100ng	1 μ g	10 μ g
H	a b c 0/44 (0%)	6/60 (10.0% \pm 3.6)	31/59 (52.5% \pm 16.0)	4/61 (6.6% \pm 3.8)
H:E=100:3	0/35 (0%)	0/45 (0%)	0/54 (0%)	0/42 (0%)
H:E=100:5	0/42 (0%)	0/46 (0%)	0/52 (0%)	0/51 (0%)
H:E=90:10	0/49 (0%)	0/51 (0%)	0/45 (0%)	0/59 (0%)
H:E=80:20	0/61 (0%)	0/50 (0%)	0/44 (0%)	0/54 (0%)
H:E=50:50	0/51 (0%)	0/56 (0%)	0/49 (0%)	0/58 (0%)
E	0/56 (0%)	0/54 (0%)	0/58 (0%)	0/52 (0%)

a : 性フェロモン活性を示した個体数

b : 供試個体数

c : 誘引率 \pm S.D.

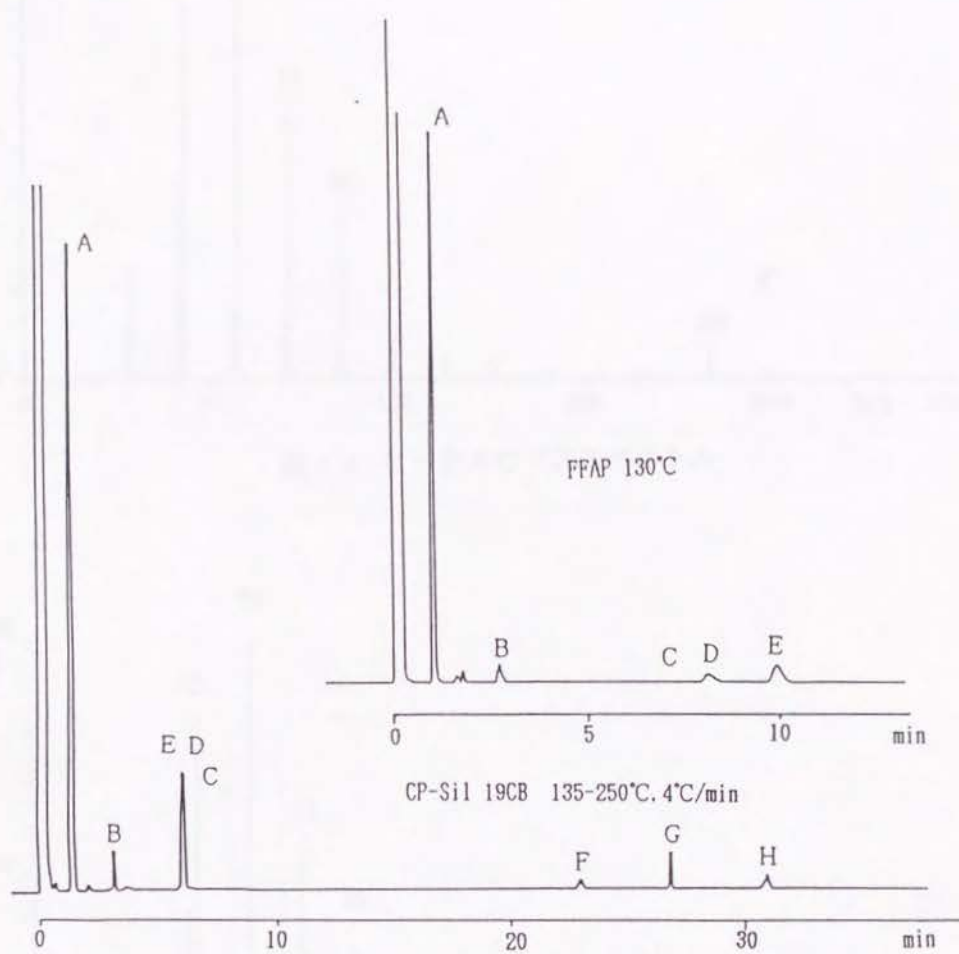


図 1 3 雄分泌性の性フェロモン活性画分のガスクロマトグラム

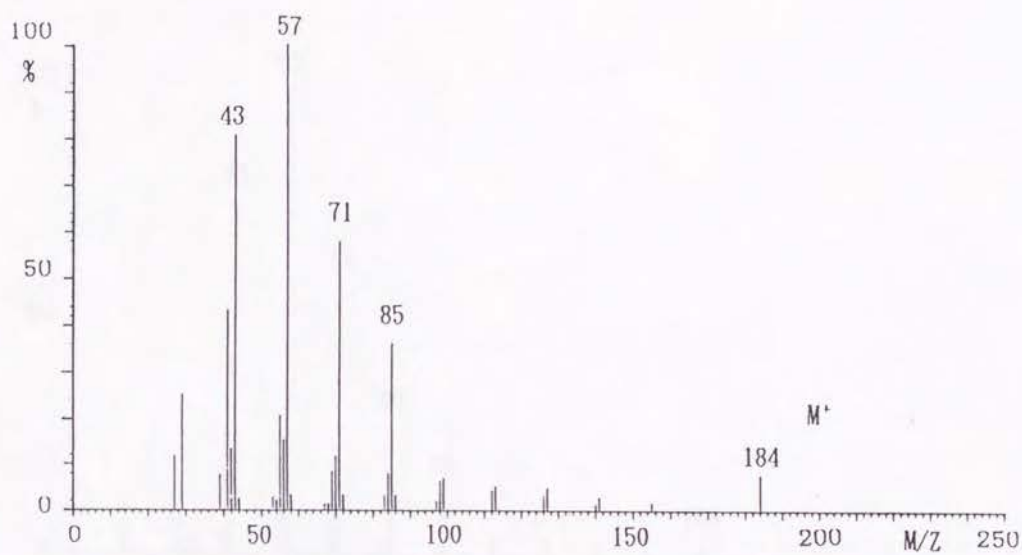


図 1 4 ピーク A のマススペクトル

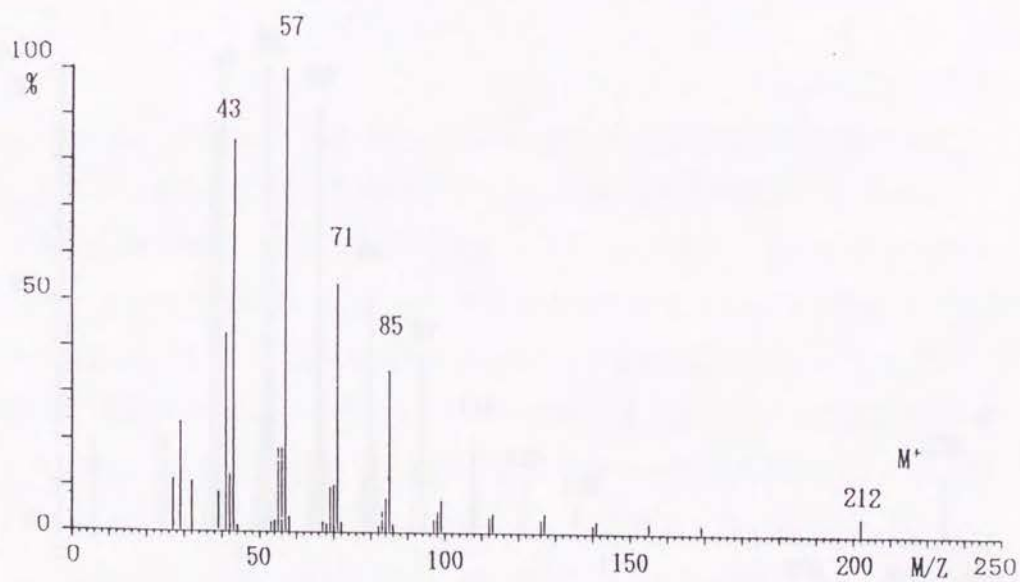


図 1 5 ピーク B のマススペクトル

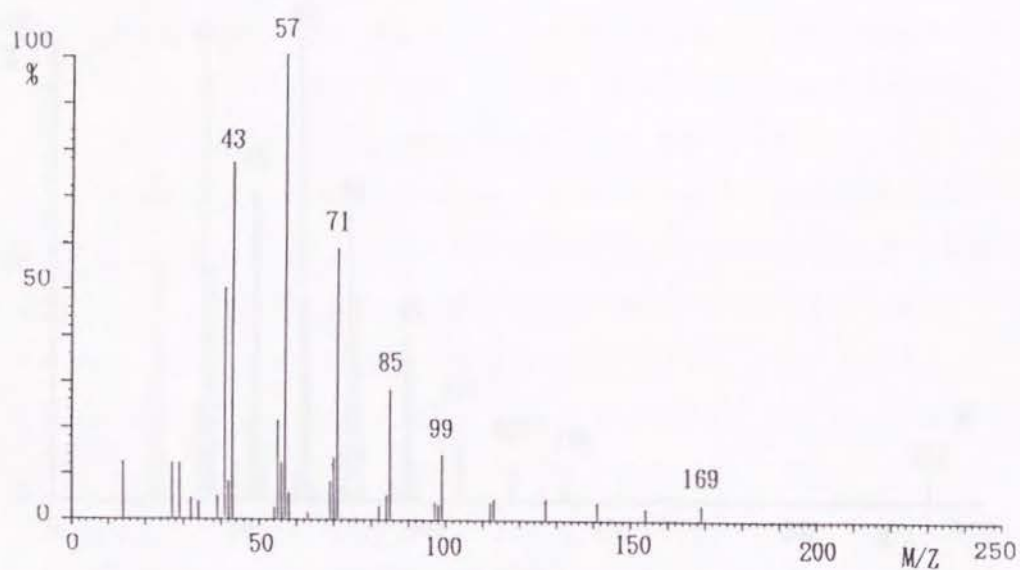


図 16 ピークCのマスペクトル

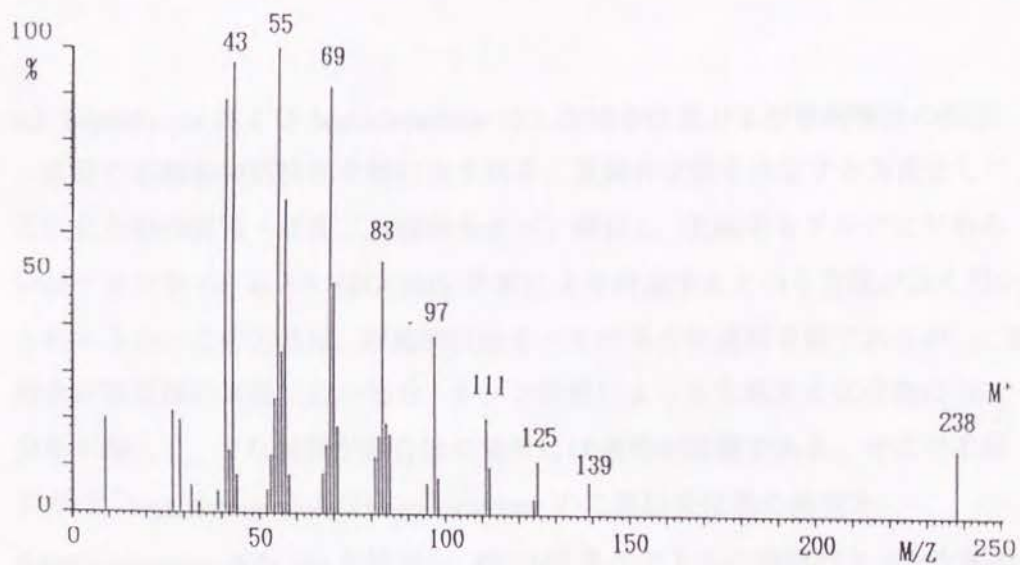


図 17 ピークDのマスペクトル

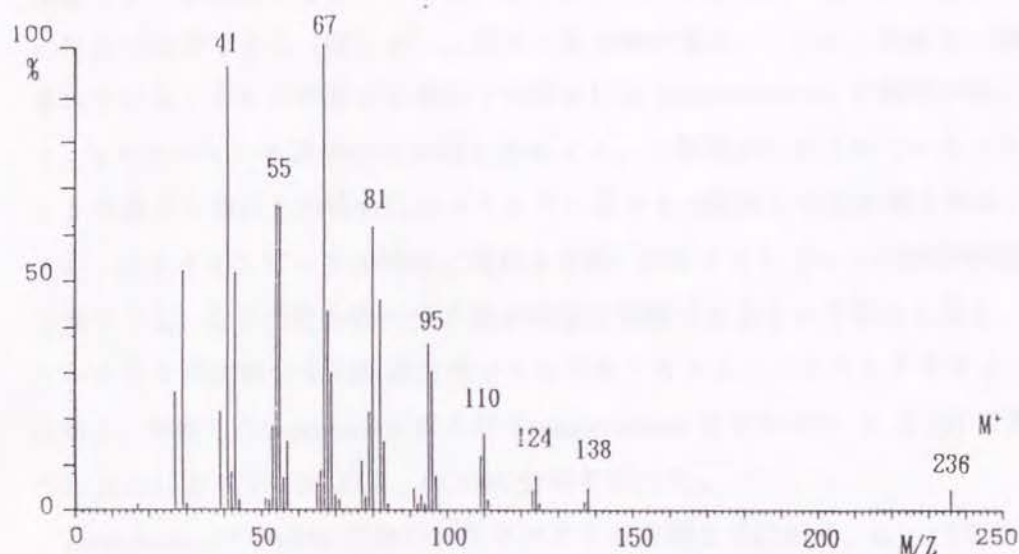


図 1 8 ピーク E のマススペクトル

(c) heptadecene および heptadecadiene の二重結合位置および幾何構造の決定

直鎖の不飽和脂肪族化合物に含まれる二重結合位置を決定する方法として、目的化合物の炭素・炭素二重結合をオゾン酸化し、生成するアルデヒドあるいはケトンを経 GC あるいは GC/MS 分析により同定するという方法が良く用いられてきた。この方法は、理論的にはすべての場合に適用可能であるが、二重結合が炭素鎖の末端に近い場合、オゾン分解によって生成する化合物の GC 分析が難しく、また試料が混合物の場合には適用が困難である。そこで本研究では、heptadecene および heptadecadiene の二重結合位置の決定を、dimethyldisulfide (DMDS) を付加し、GC/MS スペクトルの開裂パターンを解析する方法を試みた^{11, 12)}。この方法は、DMDS をヨウ素触媒下に二重結合を含む化合物と反応させ、二重結合炭素にメチルチオ基を付加導入するものであ

る。その生成物を GC/MS 分析すると、メチルチオ基の付加した炭素炭素間の結合（もとの二重結合部分）が開裂して生成するイオンが観察される。この開裂イオンを解釈することにより、特にモノエンの場合は一義的に二重結合の位置が決定できる（図 19）。ジエン化合物の場合、二つの二重結合に挟まれているメチレンの数が 3 個以下の場合には dimethylsulfide の脱離が起こり、S を含む 4 - 6 員環状化合物を形成する。二重結合に挟まれているメチレンの数が 4 個以上の場合にはメチルチオ基が 4 つ結合した化合物となる。また、分子イオンピークが明確に現れるため、分子イオンピークの観測が困難な場合でも、もとの化合物の分子量が明確に判断できるという利点もある。

ヘキサン溶出画分を硝酸銀含有シリカゲル・カラム・クロマトグラフィーに供し、単離した heptadecene および heptadecadiene をそれぞれ I. 2. (5) で述べた方法により DMDS 化し、GC/MS 分析を行った。

heptadecene の DMDS 化物のマススペクトルを図 20 に示す。m/z 159 と 173 の開裂イオンから二重結合の位置は 8 位と判明した。heptadecadiene の DMDS 化物のマススペクトルは図 21 に示す。2 種類の環状 DMDS 誘導体の開裂した m/z 131, 231, 159, および 203 の開裂イオン, m/z 231, および 203 からそれぞれ CH_3SH (m/z 48) が脱離した m/z 183 と 155 が観測されることから、二重結合の位置は 6 位と 9 位と判明した。各開裂イオンの帰属を図 22 に示した。

8-heptadecene と 6,9-heptadecadiene の GC/FT-IR 分析を行ったところ、トランス二重結合の存在を示す 970cm^{-1} 付近の吸収が観測されなかった。そこで、この 2 つの不飽和炭化水素の幾何異性を、それぞれ (Z) 体、および (Z,Z) 体と推定した。(Z)-(8)-heptadecene と (Z,Z)-(6,9)-heptadecadiene を合成し、単離した (8)-heptadecene と (6,9)-heptadecadiene とを、強極性のキャピラリー・カラム

(FFAP, 温度条件 130°C 一定) を用いて GC 共注入法で分析を行ったところ、それぞれピークは一つしか観測されなかった (tR' それぞれ 7.98 分, 9.71 分)。このことから、これら不飽和炭化水素の幾何異性はそれぞれ (Z) 配置と (Z,Z) 配置と決定できた。

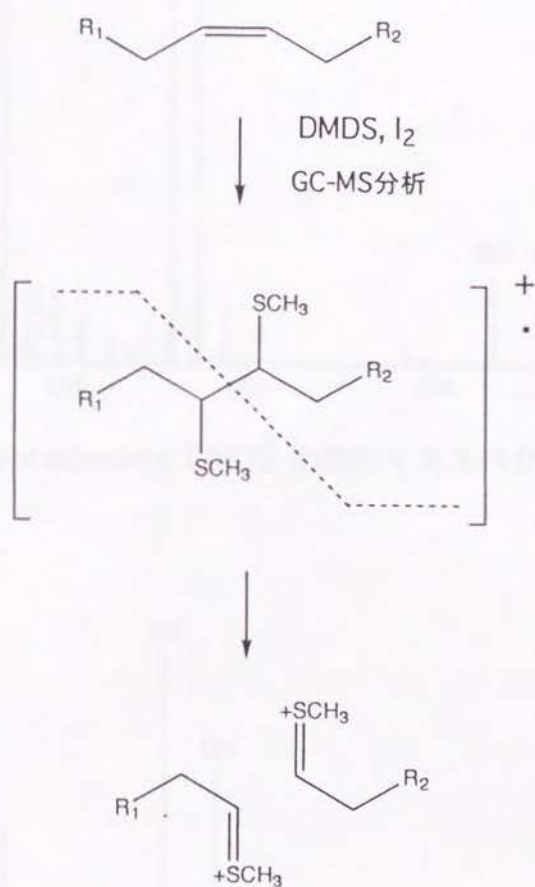


図19 DMDS化法による二重結合位置の決定法

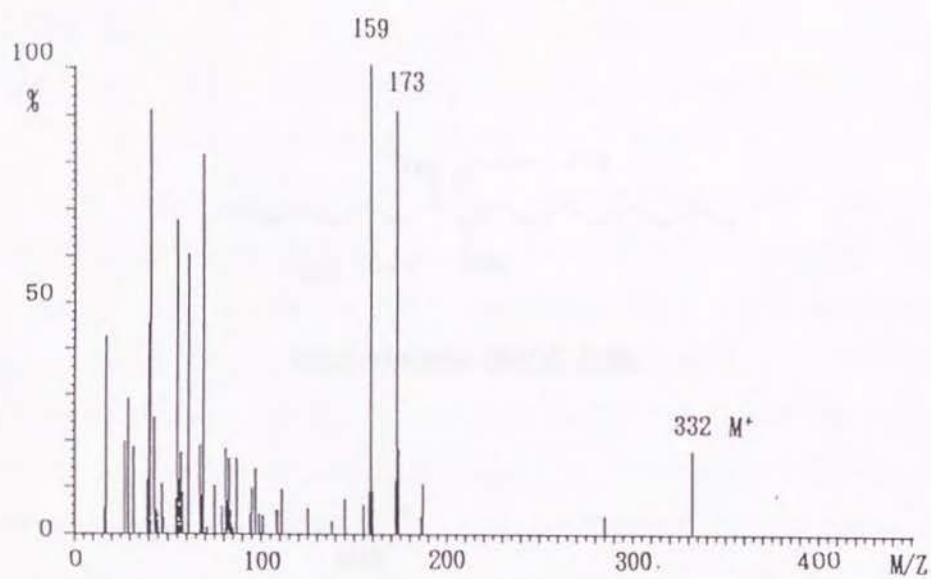


図 2 0 heptadecene DMDS 化物のマススペクトル

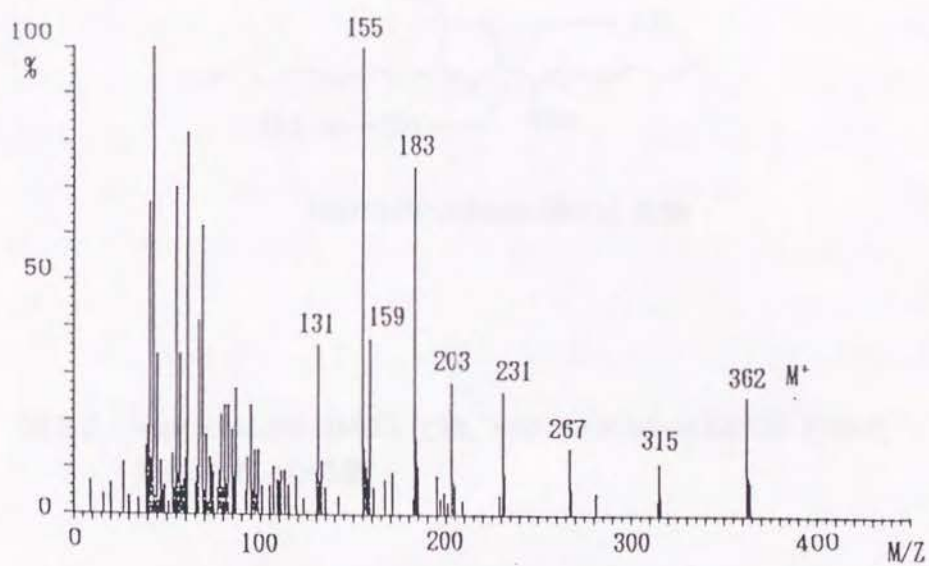
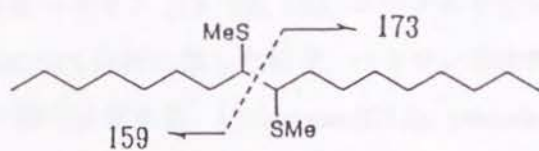
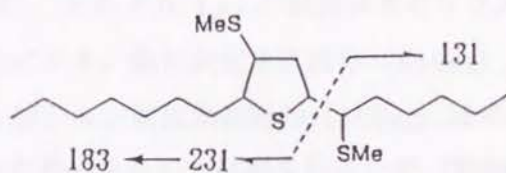
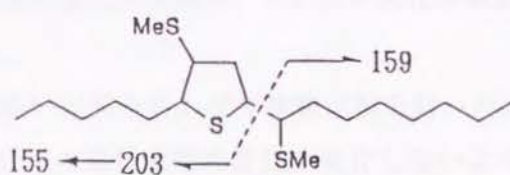


図 2 1 heptadecadiene DMDS 化物のマススペクトル



heptadecene DMDS 化物



heptadecadiene DMDS 化物

図 2 2 heptadecene DMDS 化物, heptadecadien DMDS 化物の
開裂イオンの帰属

(d) 活性画分の再分画とその生物試験

雌誘引活性のある炭化水素画分を 10% 硝酸銀含有シリカゲルを充填材に用いたカラム・クロマトグラフィーによりさらに精製し、各画分について生物試験を試みた。精製法と各画分の収量は図 2・3 に示す。溶出溶媒としてヘキサン、エーテル含有ヘキサン (1%, 3%, 5%), エーテルを用いた。得られた各画分を GC および GC/MS 分析に供した結果、ヘキサン溶出画分 (5.1mg) には以下に示す 6 種の飽和炭化水素 [tridecane (C13), pentadecane (C15), heptadecane (C17), pentacosane (C25), heptacosane (C27), および nonacosane (C29)] が、エーテル 1% 含有ヘキサン溶出画分 (0.2mg) にはモノエン炭化水素の (Z)-8-heptadecene (C17:1) が、エーテル 3% 含有ヘキサン溶出画分 (1.6mg) にはジエン炭化水素の (Z,Z)-6,9-heptadecadiene (C17:2) が含まれていた。以下、それぞれの画分を飽和炭化水素画分、モノエン炭化水素画分、およびジエン炭化水素画分とする。

各画分を単独あるいは組み合わせて生物試験を行った。画分を組み合わせる場合は、活性画分中の炭化水素の量比が変化しないように、各画分を 10ml のヘキサンに溶解し、それぞれ 1 μ l の試料溶液をガラス球に塗布した。生物試験の結果は表 3 に示す。飽和炭化水素画分 (510ng)、モノエン炭化水素画分 (20ng)、およびジエン炭化水素画分 (160ng) は単独では活性が認められなかった。2 つの画分を合わせて試験を行ったが (飽和炭化水素画分 + モノエン炭化水素画分、飽和炭化水素画分 + ジエン炭化水素画分、モノエン炭化水素画分 + ジエン炭化水素画分)、いずれも全く活性が無い、非常に弱い活性しか認められなかった。しかし、3 つの画分を合わせると誘引活性が回復した (誘引率 40.8%)。このことから雌の誘引活性の発現には飽和、モノエン、およびジエン炭化水素のいずれもが必須であることが判明した。



図23 雄分泌性の性フェロモン活性画分の再分画

表3 飽和、モノエン、ジエン炭化水素画分の雄分泌性の性フェロモン活性

fraction	性フェロモン活性
Fr. S.	0 ^a / 56 ^b (0%) ^c
Fr. M.	0 / 58 (0%)
Fr. D.	0 / 72 (0%)
Fr. S. + Fr. M.	4 / 68 (5.5% ± 4.0)
Fr. S. + Fr. D.	6 / 70 (7.5% ± 8.1)
Fr. M. + Fr. D.	0 / 67 (0%)
Fr. S. + Fr. M. + Fr. D.	25 / 63 (40.8% ± 11.6)

Fr. S. : 飽和炭化水素画分 (510ng)

Fr. M. : モノエン炭化水素画分 (20ng)

Fr. D. : ジエン炭化水素画分 (160ng)

a : 性フェロモン活性を示した個体数

b : 供試個体数

c : 誘引率 ± S.D.

(c) 合成炭化水素混合物の生物試験

合成炭化水素を混合し雄分泌性の性フェロモンの活性を再現できるかどうか検討を行った。飽和炭化水素 (C13, C15, C17, C25, C27, および C29) は市販の試薬を用い, 2種の不飽和炭化水素は I. 4. (2) に述べる方法により合成したものを用いた。

I. 3. (4)で述べるが, C15, C17, C17:1, および C17:2 は雄だけが持つ炭化水素で, 雌と若虫は持たない。これらの雄に特異的な炭化水素が雄分泌性の性フェロモンの活性を持つと考え, これらを天然成分比 (C15:C17:C17:1:C17:2 = 1:0.2:1:2) で混合し生物試験をした。投与量は $1\mu\text{g}$ 炭化水素画分当量とした。しかし, 誘引活性は全く認められず, 試料の刺激によって動き出す行動も非常に弱いものであった。活性の発現には雄特有の炭化水素以外に雌雄共通の炭化水素が必要であることが示唆された。雌雄共通の炭化水素であるC13を加えた炭化水素混合物を調製し (C13:C15:C17:C17:1:C17:2 = 10:1:0.2:1:2), 同様に $1\mu\text{g}$ 炭化水素画分当量の投与量で生物試験を行った。試料を塗布したガラス球への定位行動は全く観察されなかったが, ほとんどの雌は試料に反応し試験容器内を動き回る行動を示した。このことから, 活性画分に含まれる高沸点炭化水素 (C25, C27, C29) が低沸点炭化水素の蒸発速度を調節し, 誘引源への定位行動を可能にすると考えられた。

そこで, この炭化水素混合物にさらに雌雄共通の高沸点炭化水素 (C25, C27, C29) を加えた炭化水素混合物を調製し (C13:C15:C17:C17:1:C17:2:C25:C27:C29 = 10:1:0.2:1:2:0.5:1:0.5), 生物試験を行った。その結果とヘキサン溶出画分の生物試験結果の比較を図24に示す。合成炭化水素混合物は投与量 100ng で 22.7%, 300ng で 28.8% の雌を誘引し, 天然炭化水素画分とはほぼ同じ誘引活性を示した。しかし, $1\mu\text{g}$ の投与量においては, 天然炭化水素画分は誘引率 51.8% という強い活性を示すが, 合成炭化水素混合物では 7% と誘引率は低くなった。しかし, この際, 多くの雌は静止しておらず, 激しく生物試験容器内を動き回った。この現象は, 合成

炭化水素混合物には高濃度となったときに誘引源への定位行動を妨げる要因が存在するためと考えられた。例えば、微量の不純物が定位行動を妨害している、未同定の活性成分がまだ存在している、合成炭化水素混合物の組成比が天然活性画分のそれと完全に一致していない等の原因が考えられる。

以上の結果から、雄分泌性の性フェロモン活性の発現には雄特有の炭化水素（C15, C17, C17:1, および C17:2）と雌雄共通の炭化水素（C13, C25, C27, および C29）の両方が必須であることがうらづけられた。

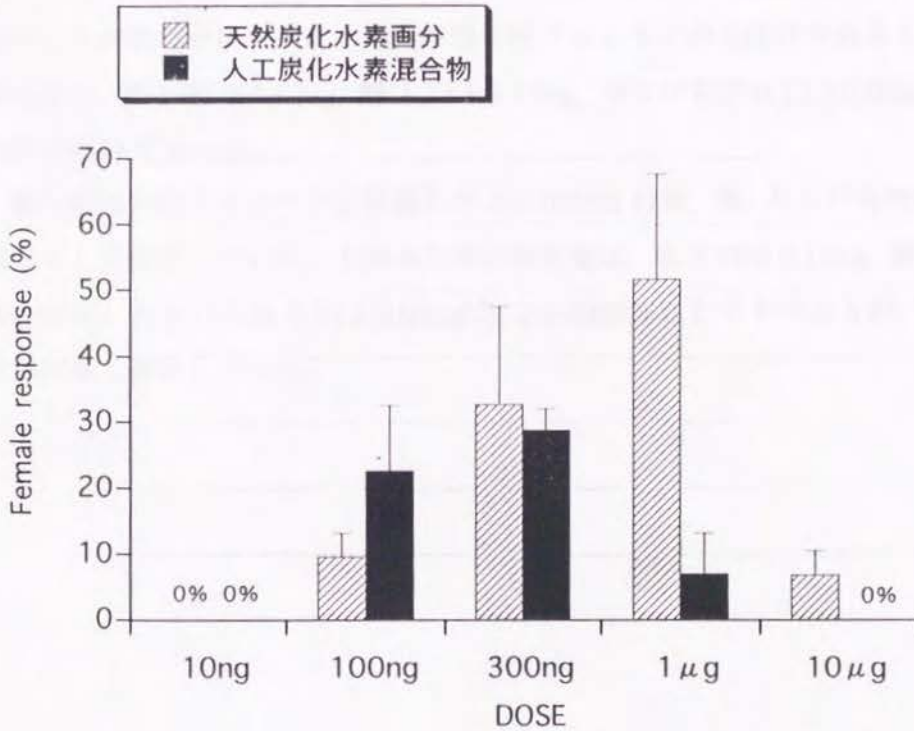


図24 天然炭化水素画分と人工炭化水素混合物との雄分泌性の性フェロモン活性の比較

(4) GC による雌雄, および若虫分泌成分の比較と性フェロモンの定量

I. 2. (2) に述べた方法により, 雄 200 頭, 雌 200 頭, および若虫 400 頭のヘキサン抽出物を得た。これらの典型的なガスクロマトグラム (CP-Sil 19CB, 135–250℃, 4℃/min) をそれぞれ図25, 図26, 図27に示す。ピーク A は C13, ピーク B は 2,6-HMBD, ピーク C は C15, ピーク F は C17, C17:1, C17:2 が重なったピークと同定することができた。ピーク D, E, G は未同定化合物である。この典型的なクロマトグラムより計算した雄, 雌, および若虫抽出物の成分組成比を表4に示す。

雄分泌性の性フェロモンの成分である C13 は雄, 雌, および若虫に存在した。C15, C17, C17:1, および C17:2 は雄にのみ存在し, 雌と若虫には存在しないことが明らかになった。雄分泌性の性フェロモンの主成分である C13 の存在量は, 雄 $1.91 \pm 0.43\text{ng}$, 雌 $1.74 \pm 0.18\text{ng}$, および若虫 $0.13 \pm 0.04\text{ng}$ (平均値 \pm S.D.) であった。

雌分泌性の性フェロモンと結論した 2,6-HMBD は雄, 雌, および若虫に主成分として存在していた。1 頭あたりの存在量は, 雄 $3.78 \pm 0.12\text{ng}$, 雌 $2.87 \pm 0.09\text{ng}$, および若虫 $0.22 \pm 0.03\text{ng}$ で, 2,6-HMBD はわずかであるが, 雌より雄に多く存在していた。

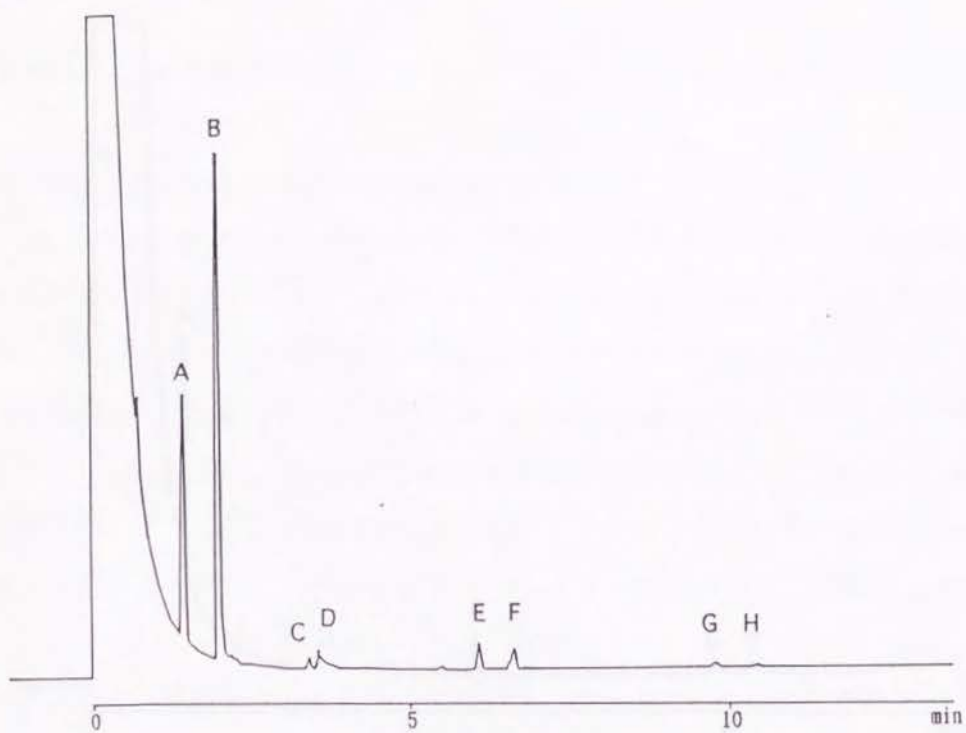


図 2 5 雄ヘキサン抽出物のガスクロマトグラム

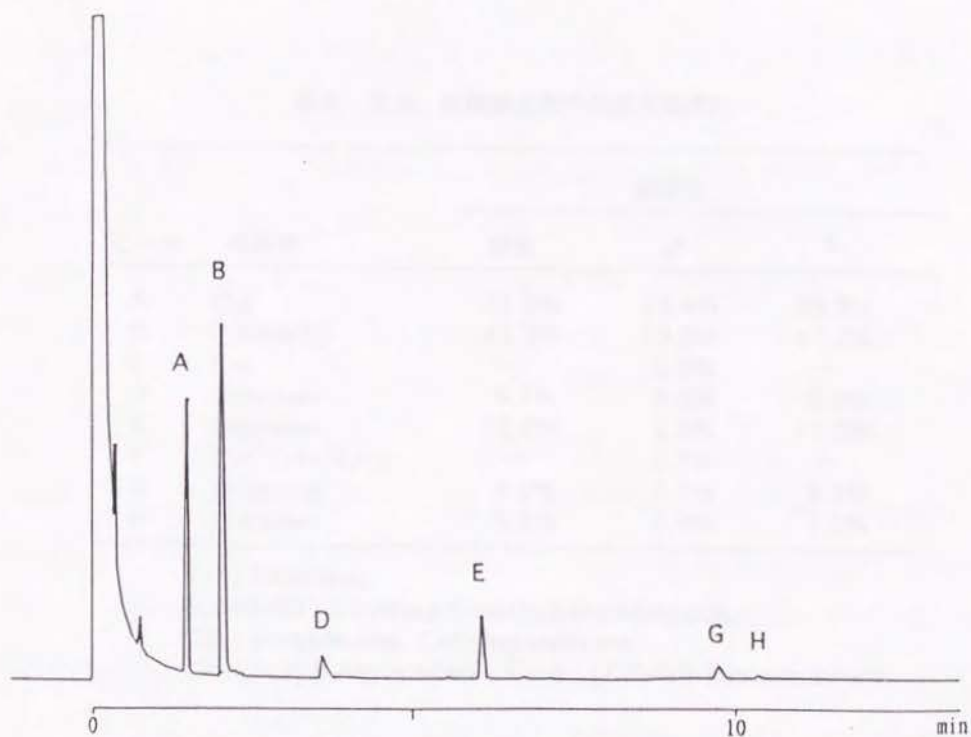


図 2 6 雌ヘキサン抽出物のガスクロマトグラム

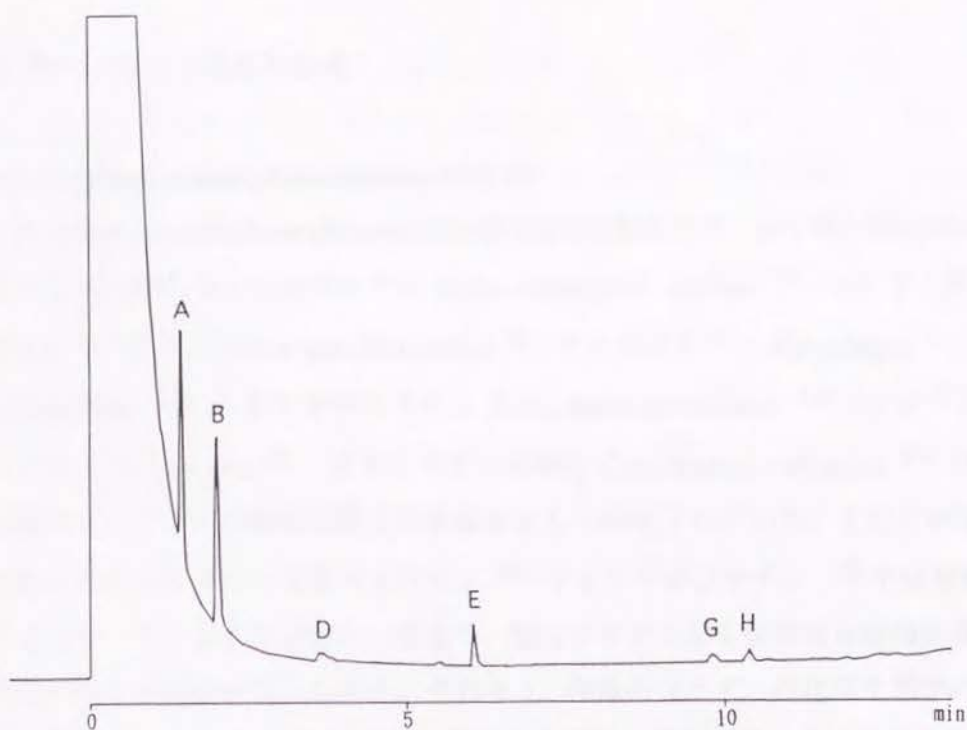


図 2 7 若虫ヘキサン抽出物のガスクロマトグラム

表 4 若虫、雄雌抽出物中の成分組成比

ピーク	化合物	組成比		
		若虫	♂	♀
A	C13	23.5%	28.4%	28.9%
B	2,6-HMBD	43.3%	59.5%	47.6%
C	C15	—	0.8%	—
D	Unknown	6.7%	3.6%	6.8%
E	Unknown	12.2%	2.9%	11.2%
F	C17, C17:1, C17:2	—	3.1%	—
G	Unknown	4.6%	1.1%	4.3%
H	Unknown	5.8%	0.4%	1.2%

C13 : tridecane,

2,6-HMBD : 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde,

C15 : pentadecane, C17 : heptadecane,

C17:1 : (Z)-8-heptadecene, C17:2 : (Z,Z)-6,9-heptadecadiene

4. 性フェロモン成分の合成

(1) 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde の合成

2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde (2,6-HMBD) は現在まで、コナダニ類ではヒョウヒダニ科のコナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae*¹⁴⁾、コナダニ亜科のムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus*⁸⁾、ケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae*¹⁵⁾、オオケナガコナダニ *Tyrophagus perniciosus*¹⁵⁾、アシブトコナダニ *Acarus siro*¹⁶⁾、およびネダニ亜科の *Caloglyphus rodriguezi*¹⁷⁾ の6種のコナダニの後胴体部腺分泌物成分として同定されている。またこの化合物はムギコナダニでは性フェロモン⁸⁾、オオケナガコナダニ¹⁸⁾では警報フェロモンであることがわかっており、他のコナダニでも化学的な情報伝達物質である可能性が考えられる。それゆえ、今後のコナダニの化学生態学の研究を進めるうえで、2,6-HMBD の簡便な合成法を確立することは非常に重要である。

本研究では、*m*-cresol を原料として 2,6-HMBD を合成することを計画し、Fries 転移によって *m*-cresol formate から合成する方法を検討した¹⁸⁾。しかし、この方法では異性体の 2-hydroxy-4-methylbenzaldehyde (2,4-HMBD) が主生成物(約90%)となり、目的とする 2,6-HMBD は副生成物(約10%)になる。両者は通常のシリカゲル、アルミナなどを充填材に用いた順相カラム・クロマトグラフィーでは分離が困難であるため、ガスクロマトグラフィー分取による分離を考えた。しかし、多量の異性体を含む状態では精製に時間がかかってしまうため、2,4-HMBD が生成しない合成法の確立を試みた。

その際、ホルミル基の導入は *n*BuLi を用いた芳香族水素の deprotonation (lithiation) によって生ずるリチウム誘導体に dimethylformamide (DMF) を処理する方法を用いた。この方法では酸素原子の持つ ortho directing effect により、OTHP 基の隣の位置を特異的にホルミル化することができる¹⁹⁾。

この反応を *m*-cresol で行ったところ 98% は *m*-cresol tetrahydropyranylether の6位がホルミル化され、目的の 2,6-HMBD はほとんど合成されなかった。

これは 2 位の水素が 3 位のメチル基の影響で deprotonation されにくくなっており、その結果、2 位にほとんど lithiation が起こらなかったためと考えた。そこで最初に trimethylsilyl (TMS) 基を 6 位に導入し²⁰⁾、得られた 3-methyl-6-trimethylsilylphenol tetrahydropyranyl ether をふたたび *n*-BuLi で lithiation を行い 2 位にホルミル基を導入したあと TMS 基を外すことで 2,6-HMBD の合成を行った²¹⁾。合成方法は図28に示す。全行程の収率 44.2% で最終的に得られた油状物質は 2,6-HMBD (91%) と 2,4-HMBD (9%) の混合物であったため、ガスクラマトグラフィー分取を行い 2,6-HMBD を精製した。微量の異性体が生成してしまった原因は、TMS基を導入する反応での未反応物を、完全に除くことができず次のホルミル化を行ってしまったためと考えられる。

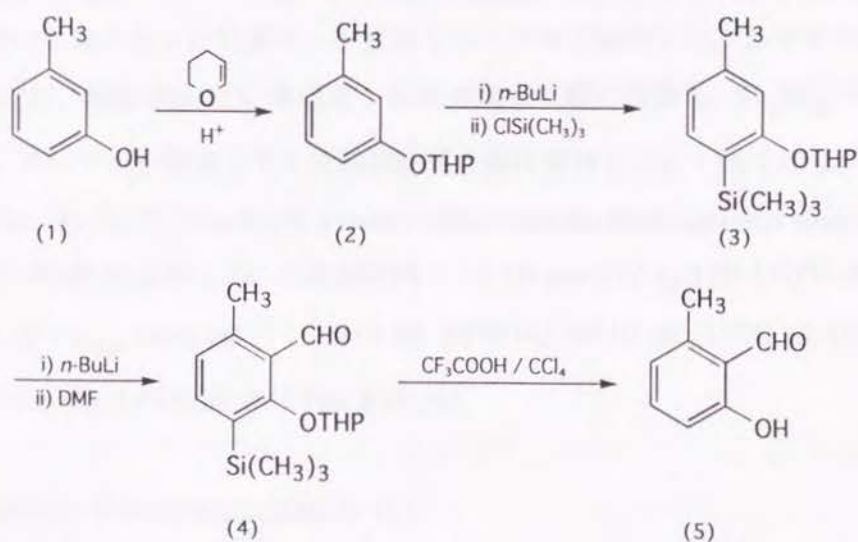


図28 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde (5) の合成法

実験の部

3-methyl phenol tetrahydropyranyl ether (2)

氷冷した dihydropyran と conc. HCl (2 滴) の混液に *m*-cresol (1) (13g, 120mmol) を徐々に加えた。室温で2 時間攪拌した後、エーテルを加え 2N NaOH, 飽和食塩水で順に洗浄し、有機層を Na_2SO_4 で乾燥した。有機層から得た粗生成物をシリカゲル・カラムで精製し、21.9g の目的物 (2) を得た (収率95.0%)。GC の保持時間: 6.33min (OV-1, 100-170°C, 5°C/min).

3-methyl-6-trimethylsilylphenol tetrahydropyranyl ether (3)

3-methylphenol tetrahydropyranyl ether (2) (19.2g, 100mmol)のエーテル溶液 (100ml) に *n*-BuLi (1.6M ヘキサン溶液, 70ml, 110mmol)を窒素気流下に加え、12時間室温で攪拌した。これに、trimethylsilyl chloride (12g, 110mmol)のキシレン溶液を加えたのち 70-80 °Cで2 時間還流した。室温まで放冷した反応液を、砕いた氷の入った分液ロートに移しエーテルで抽出した。エーテル層は 2N NaOH, 飽和 NaHCO_3 水溶液, 飽和食塩水で順に洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。エーテルを留去してえた油状物質を減圧蒸留し (bp. 135-140°C, 2mmHg), 17.2g の 3-methyl-6-trimethylsilylphenol tetrahydropyranyl ether (3) を得た (収率 65.2%)。GC の保持時間: 11.70 min (OV-1, 100-170°C, 5°C/min). IR ν_{max} (film) cm^{-1} : 2940 (s), 2870 (m), 2840 (m), 1590 (s), 1550 (m), 1390 (m), 1230 (m), 965 (m), 830 (m).

2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde (5)

氷冷した3-methyl-6-trimethylsilylphenol tetrahydropyranyl ether (3) (17.2g, 65mmol) の THF 溶液 (100ml) に *n*-BuLi (1.6M ヘキサン溶液, 45ml, 72mmol) を窒素気流下に加え、1 時間室温で攪拌した。これに DMF (14g, 195mmol) のエーテル溶液を加え1 時間攪拌した後、反応液を 2N HClで酸性化し1 時間攪拌した。反応液をエーテルで抽出し、エーテル層を 2N HCl, 飽

和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を留去して得た油状物質 (18.8g) を CCl_4 20ml に溶かし、 CF_3COOH 10ml を加え、12時間室温で攪拌した。反応液にエーテルを加え、有機層を 飽和 NaHCO_3 水溶液、飽和食塩水で順に洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を留去して得られた油状物質をシリカゲル・カラムで精製し、6.3g の 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde (5) と 2-hydroxy-4-methylbenzaldehyde の 10 : 1 混合物を得た (計算上の収率 64.8%)。この 2 つの異性体を分離するため、混合物 100 μl を GC 分取に供し (20% FFAP, 120 $^\circ\text{C}$ 一定), 無色油状物質 (5) を 46mg と、無色油状物質 2-hydroxy-4-methylbenzaldehyde を 3mg 得た。

2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde (5) の機器分析データ

MS m/z (%) : 136 (M^+ , 81), 135 (100), 118 (13), 108 (7), 107 (16), 90 (29), 89 (16), 77 (38). IR ν_{max} (vapor) cm^{-1} : 2800 (m), 1666 (s), 1620 (m), 1454 (m), 1327 (m), 1296 (m), 1234 (m), 1191 (m), 968 (w), 725 (m). $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500MHz) : 2.67 (3H, s), 6.71 (1H, d, $J=7.4\text{Hz}$), 6.81 (1H, d, $J=8.4\text{Hz}$), 7.81 (1H, t, $J=8.4\text{Hz}$, 7.4Hz), 10.33 (1H, s), 11.90 (1H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (125.7MHz) : 18.10 (CH_3), 116.15 (Ar. C), 116.60 (Ar. C), 121.63 (Ar. C), 137.44 (Ar. C), 142.13 (Ar. C), 163.25 (Ar. C), 195.34 (CHO).

2-hydroxy-4-methylbenzaldehyde の機器分析データ

MS m/z (%) : 136 (M^+ , 90), 135 (100), 118 (15), 108 (5), 107 (16), 90 (31), 89 (16), 77 (37). IR ν_{max} (vapor) cm^{-1} : 2935 (w), 2835 (m), 1674 (s), 1631 (m), 1577 (m), 1512 (m), 1450 (m), 1377 (m), 1350 (m), 1319 (m), 1288 (m), 1200 (m), 1130 (m), 960 (m), 802 (w), 723 (m). $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500MHz) : 2.37 (3H, s), 6.78 (1H, s), 6.82 (1H, d, $J=7.9\text{Hz}$), 7.86 (1H, d, $J=7.9\text{Hz}$), 9.81 (1H, s), 11.03 (1H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (125.7MHz) : 22.20 (CH_3), 117.74 (Ar. C),

118.71 (Ar. C), 121.15 (Ar. C), 133.59 (Ar. C), 148.91 (Ar. C), 161.77 (Ar. C), 195.82 (CHO).

(2) (Z,Z)-6,9-heptadecadiene および (Z)-8-heptadecene の合成

コナダニの後胴体部腺分泌物には飽和、不飽和を含め多様な炭化水素が存在している。本研究でこれらの炭化水素混合物が性フェロモンの機能を持つことが判明した。また、オンシツケナガコナダニ *Tyrophagus neiswanderi* では C13, C14, C15, のモノエン混合物が警報フェロモン活性を持つことが明らかにされている²²⁾。分泌腺成分の炭化水素組成は多くの場合、種によってまったく異なっており、他のコナダニ類でも情報化学物質として機能していると推測される。このことから、本研究で同定された不飽和炭化水素の合成法を確立することはコナダニの化学生態学を研究するうえで非常に重要である。

(Z, Z)-6,9-heptadecadiene の合成は以下の5工程で行った(図29)。

- (i) 1-bromoheptane (6) と 1-tetrahydropyranoxyl-2-propyne (7) のアセチレンカップリング²³⁾。
 - (ii) 1-tetrahydropyranoxyl-2-decyne (8) の Lindlar 触媒による (Z) 体への接触還元²⁴⁾。
 - (iii) 1-tetrahydropyranoxyl-(Z)-2-decene (9) の dibromotriphenyl-phosphorane ($P\phi_3Br_2$) による臭素化物への変換²⁵⁾。
 - (iv) 1-bromo-(Z)-2-decene (10) と 1-heptyne (11) のアセチレンカップリング。
 - (v) (Z)-9-heptadecen-6-yne (12) の Lindlar 触媒による (Z, Z) 体への接触還元。
- 全工程での収率は 5.3% であった。

また、(Z)-8-heptadecene の合成は以下の2工程で行った(図29)。

- (i) 1-bromoheptane (6) と 1-decyne (14) のアセチレンカップリング。
- (ii) 8-heptadecyne (15) の Lindlar 触媒による (Z) 体への接触還元。

全工程での収率は 56.5% であった。

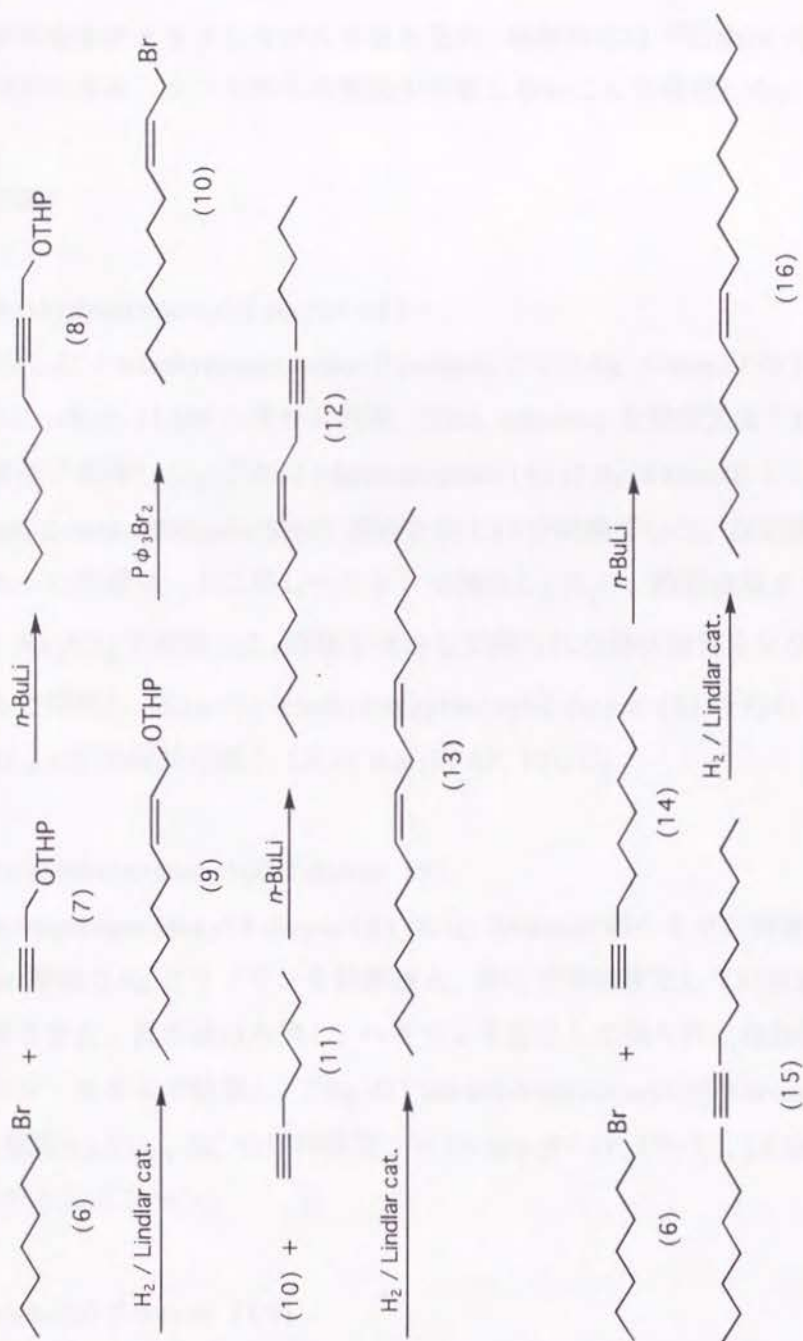


図 29 (Z,Z)-6,9-heptadecadiene (13) および (Z)-8-heptadecene (16) の合成法

微量の幾何異性体が混入することで性フェロモン活性の発現に影響を及ぼす可能性があるため、極性カラムを用いたガスクロマトグラフィーで幾何異性体の存在をチェックしながら合成を進め、最終的には ^{13}C -NMR の二重結合炭素のケミカル・シフトから異性体が存在しないことを確認した。

実験の部

1-tetrahydropyranoxyl-2-decyne (8)

氷冷した *1-tetrahydropyranoxyl-2-propyne* (7) (5.6g, 40mmol) の THF 溶液 (50ml) に *n*-BuLi (1.6M ヘキサン溶液, 30ml, 48mmol) を窒素気流下に加え、5分間室温で攪拌した。これに *1-bromoheptane* (6) (7.9g, 44mmol) の *1,3*-dimethyl-2-imidazolidinone (DMI) 溶液を加え15分間攪拌した。反応液を砕いた氷の入った分液ロートに移しヘキサンで抽出し、 H_2O 、飽和食塩水で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を留去して得られた油状物質をシリカゲル・カラムで精製し、8.1g の *1-tetrahydro-pyranoxyl-2-decyne* (8) を得た (収率 85.0%)。GC の保持時間：13.34 min (FFAP, 170°C)。

1-tetrahydropyranoxyl-(Z)-2-decene (9)

1-tetrahydropyranoxyl-2-decyne (8) (8.1g, 34mmol) のヘキサン溶液 (50ml) に Lindlar 触媒 0.8g とキノリンを数滴加え、常圧で接触還元して計算量の水素を吸収させた。反応液はろ過し、ヘキサンを留去して得られた油状物質をシリカゲル・カラムで精製し、7.6g の *1-tetrahydropyranoxyl-(Z)-2-decene* (9) を得た (収率93.5%)。GC の保持時間：6.18 min (FFAP, 170°C), 18.58 min (OV-1, 60 - 250°C , $5^\circ\text{C}/\text{min}$)。

1-bromo-(Z)-2-decene (10)

dibromotriphenylphosphorane (7.0g, 17mmol) の塩化メチレン溶液 (100ml) に *1-tetrahydro-pyranoxyl-(Z)-2-decene* (9) (3.7g, 15mmol) を窒素気流下に加え

30分間攪拌した。反応液を砕いた氷の入った分液ロートに移しヘキサンで抽出し、 H_2O 、飽和食塩水で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を留去して得られた油状物質をシリカゲル・カラムで精製し、2.6gの1-bromo-(*Z*)-2-decene (10) を得た (収率76.6%)。GCの保持時間：22.84 min (OV-1, 60-250°C, 5°C/min).

(*Z*)-9-hepadecen-6-yne (12)

氷冷した 1-heptyne (11) (1.06g, 11mmol) の THF 溶液 (50ml) に *n*-BuLi (1.6M ヘキサン溶液, 7ml, 11mmol) を窒素気流下に加え、5 分間室温で攪拌した。これに1-bromo-(*Z*)-2-decene (10) (2.58g, 11.8mmol) の 1,3-dimethyl-2-imidazolidinone (DMI) 溶液を加え15分間攪拌した。反応液を砕いた氷の入った分液ロートに移しヘキサンで抽出し、 H_2O 、飽和食塩水で洗浄した後、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を留去して得られた油状物質を 5% KOH 含有エタノール中で3 時間還流し、未反応の臭化物を除いた後、シリカゲル・カラムで精製し、2.67g の(*Z*)-9-hepadecen-6-yne (12) を得た (収率96.6%)。GC の保持時間：20.88 min (FFAP, 130°C).

(*Z,Z*)-6,9-heptadecadiene (13)

(*Z*)-9-hepadecen-6-yne (12) (2.67g, 11.4mmol) のヘキサン溶液 (50ml) に Lindlar 触媒 0.3g とキノリンを数滴加え、常圧で接触還元して計算量の水素を吸収させた。反応液はろ過し、ヘキサンを留去して得られた油状物質を、シリカゲル・カラム、 AgNO_3 含有シリカゲル・カラムで順次精製し、0.5g の (*Z,Z*)-6,9-heptadecadiene (13) を得た (収率18.6%)。GC の保持時間：9.56 min (FFAP, 130°C). IR ν_{max} (vapor) cm^{-1} : 3016 (s), 2935 (m), 2866 (m), 2368 (w), 1461 (w), 1400 (w), 717 (w). $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500MHz) : 0.89 (3H, t, $J=4.58\text{Hz}$), 0.90 (3H, t, $J=4.62\text{Hz}$), 1.28-1.38 (16H, br. m), 2.05 (4H, q, $J=6.8\text{Hz}$), 2.78 (2H, t, $J=6.8\text{Hz}$), 5.35 (4H, m, $J=6.8\text{Hz}$, 10.8Hz). $^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C}

(125.7MHz): 14.07 (CH₃), 14.11 (CH₃), 22.60 (CH₂), 22.70 (CH₂), 25.67 (CH₂), 27.23 (CH₂), 27.27 (CH₂), 29.25 (CH₂), 29.32 (CH₂), 29.72 (CH₂), 31.56 (CH₂), 31.90 (CH₂), 127.98 (=CH-), 130.21 (=CH-).

8-heptadecyne (15)

氷冷した 1-decyne (14) (1.38g, 10mmol) の THF 溶液 (50ml) に *n*-BuLi (1.6M ヘキサン溶液, 7ml, 11mmol) を窒素気流下に加え, 5 分間室温で攪拌した。これに 1-bromoheptane (6) (1.79g, 10mmol) の DMI 溶液を加え 15 分間攪拌した。反応液を砕いた氷の入った分液ロートに移しヘキサンで抽出し, H₂O, 飽和食塩水で洗浄した後, Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を留去して得られた油状物質をシリカゲル・カラムで精製し, 2.10g の 8-heptadecyne (15) を得た (収率88.0%)。GC の保持時間: 20.64 min (FFAP, 130℃).

(Z)-8-heptadecene (16)

8-heptadecyne (15) (2.10g, 8.8mmol) のヘキサン溶液 (50ml) に Lindlar 触媒 0.2g とキノリンを数滴加え, 常圧で接触還元して計算量の水素を吸収させた。反応液はろ過し, ヘキサンを留去して得られた油状物質を, シリカゲル・カラムで精製した後, 減圧蒸留(bp. 125-140℃, 3mmHg) し, 0.52g の (Z)-8-heptadecene (16) を得た (収率25.0%)。GC の保持時間: 9.50 min (FFAP, 130℃). ¹H-NMR δ_H (500MHz): 0.88 (3H, t, J=6.8Hz), 1.20-1.40 (16H, br.m), 2.00 (4H, q, J=6.8Hz), 5.34 (2H, m, J=6.8Hz, 10.8Hz). ¹³C-NMR δ_C (125.7MHz): 14.12 (CH₃), 22.71 (CH₂), 27.24 (CH₂), 29.25 (CH₂), 29.31 (CH₂), 29.34 (CH₂), 29.56 (CH₂), 29.81 (CH₂), 31.93 (CH₂), 129.92 (=CH-).

5. 考察

昆虫は、一般的に性的に成熟した雌が性フェロモンを分泌し、雄を誘引して交尾を行うという性フェロモンのシステムを持っている。雌雄両方の性フェロモンを持つ種もあるが、多くの場合、雌フェロモンは遠距離誘引性であり、雄フェロモンは同種認識や雌の受け入れ姿勢の発現など、配偶行動の2次的な役割を担っている。後者の例として、マダラチョウ類 *Daniidae* のヘヤーベンシル物質が知られている²⁶⁾。また、キクイムシ類の雄が生産するフェロモンが知られているが²⁷⁾、このフェロモンは雄も雌も誘引される集合フェロモンのようなものであり、本研究で同定した雄分泌性の性フェロモンとは明かに異なると考えられる。

動物寄生性のマダニ類では、性的に成熟した雌の分泌する揮発性の2,6-dichlorophenol が雄を誘引する。雌に近づいた雄は雌の体表に存在する接触性の性フェロモンで雌の体にはい上がり生殖口を探す交尾行動をとる。さらに、雌の生殖口から分泌される脂肪酸とエクジステロイドで同種認識を行っているという^{3, 4)}。また、植物寄生性のハダニ類の場合では、雄が成虫への脱皮直前の静止期にある雌若虫を守る行動があり、この性フェロモンとして farnesol, nerolidol, および geraniol が知られている^{3, 4)}。しかし、本研究で明らかになったオソアシブトコナダニ *Acarus immobilis* の性フェロモンのシステムは昆虫や他のダニ類とは異なるものであり、配偶行動に雌雄両方の性フェロモンが必要であるコナダニ類の両方の性フェロモンを解明した最初の例と考えている。

ゴミコナダニの一種 *Caloglyphus polyphillae* において β -acaridial が⁷⁾、ムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus* において 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde (2,6-HMBD)⁸⁾ が雄に交尾行動を起こさせる雌分泌性の性フェロモンとして同定されている。ところが困ったことに、この2種の雌分泌性の性フェロモンは雌だけでなく雄にもほぼ同じ量存在するという事実がある。本研究でオソアシブトコナダニ *Acarus immobilis* の雌分泌性の性フェロモンと同定した2,6-

HMBD も、すでに同定されているこれら 2 種のコナダニの雄分泌性の性フェロモンと同様に両性に存在することが判明した。2,6-HMBD は雄成虫、雌成虫、若虫のヘキサン抽出物のそれぞれ 50.8%, 45.2%, 40.3% を占める。また、ガスクロマトグラフの検出器応答量から計算すると 1 頭あたり雄成虫は雌成虫の 1.3 倍の量の 2,6-HMBD を持つことが判明した。実際、雄を狭い生物試験容器に高い密度で入れておくと、さかんに雄同志の交尾行動が観察される。雄に交尾行動を引き起こす雌分泌性の性フェロモンを雄自身が持っているということから、雄分泌性の性フェロモンが一連の配偶行動の発現に重要な役割を演じていると考えられる。

オソアシブトコナダニ *Acarus immobilis* の雌はヘキサン粗抽出物をシリカゲル・カラム・クロマトグラフィーで精製し、ヘキサンで溶出した画分に顕著に誘引された。この画分はガスクロマトグラフ分析の結果から tridecane (60.8%), pentadecane (5.7%), heptadecane (1.7%), (Z)-8-heptadecene (6.8%), (Z,Z)-6,9-heptadecadiene (13.5%), pentacosane (1.6%), heptacosane (6.3%), および nonacosane (3.5%) の成分を含むことが判明した。雄成虫、雌成虫、および若虫のヘキサン抽出物をガスクロマトグラフ法で比較をしたところ、雄だけに pentadecane, heptadecane, (Z)-8-heptadecene, (Z,Z)-6,9-heptadecadiene のピークが認められ、雌と若虫には欠失していた。このことから、これらの炭化水素成分が雌が雄を認識する性フェロモンであると考えたが、不活性であり、活性発現には両性に共通する成分を加えることの必要性が結果的に証明された。すなわち、飽和、モノエン、およびジエン炭化水素画分の組み合わせ試験、また、合成炭化水素混合物による生物試験から、雄雌共通の炭化水素と雄特有の炭化水素の両方が雄分泌性の性フェロモン活性の発現には必要であった。雄雌共通の炭化水素のうち高沸点成分 (pentacosane, heptacosane, nonacosane) は低沸点成分の蒸発速度を遅らせて、誘引活性の発現をコントロールする役割を持つことが考えられた。本研究で同定した炭化水素混合物はコナダニ類で最初の雄分泌性の性フェロモンの同定例である。

Levinson らの報告によるとアシブトコナダニ *Acarus immobilis* の配偶行動

は以下の4ステップに分けられる。ステップ1：成熟した雌は雄に近づき、数回雄の周りを回る。ステップ2：雌の胴体部が雄の顎体部に近づいた時、雄は興奮して雌に乗ろうとする。ステップ3：続いて雄は雌の上に乗り、雌は歩き始める(0.5-1分間)。ステップ4：雄は体を180度回転して、雌の胴体部のうえに後ろ向きに乗り出して肛門吸盤と足根部吸盤で固定し、128-219分間このままでいる。雄分泌性の性フェロモンはステップ1に関係し、10-25雄等量で雌に対して最大の誘引活性を示した。雌分泌性の性フェロモンはステップ2と3に関係し、1/10雌等量と1雄等量がそれぞれ雄を誘引し、交尾行動を引き起こすという⁶⁾。しかし、それらの活性物質は同定されていない。アシプトコナダニ *Acarus siro* には tridecane, 2,6-HMBD および perillene の存在が報告されている¹⁶⁾。本研究で性フェロモンを同定した同属種オソアシプトコナダニ *Acarus immobilis* では perillene のかわりに rosefuran が存在するものの(未発表), tridecane と 2,6-HMBD を主成分として持つことから同じ性フェロモンのシステムを持つことが推測される。すなわち、雄の分泌する炭化水素成分によって雌は雄を識別し、雄に近づく(ステップ1)、すると雄は雌の分泌する 2,6-HMBD に反応し、マウント行動をおこす(ステップ2, 3)。

以上述べたように、オソアシプトコナダニ *Acarus immobilis* の配偶行動には、雌を誘引する雄分泌性の性フェロモンと、雄を性的に興奮させる雌分泌性の性フェロモンの2種類のフェロモンが関与することが明らかになった。このような性フェロモンのシステムは、他の昆虫やダニ類にはみられないユニークなものである。コナダニ類の配偶行動は多くの種でほとんど明らかになってないが、他のコナダニ類もこのような2種類の性フェロモンを持つ可能性が示唆された。

II. ヤケヒョウヒダニからの新規サリチルアルデヒド類縁体の同定

1. 緒論

ヤケヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* は無気門亜目ヒョウヒダニ科に属し、コナヒョウヒダニ *D. farinae* とともに室内塵ダニとして知られる衛生害虫である。体長 0.18–0.5 mm, 体色は白色で顎体部と脚のみが淡褐色をしている。その死骸や排泄物は喘息, アトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患の原因となることが知られている^{28, 29)}。室内で発見される種々のダニのうち, 通常もっとも個体数の多いのが, このヒョウヒダニ類 (以下, ヒョウヒダニ科に属するダニ類の総称とする) であり, 全ダニ数の 80–90% を占めている。現在ヒョウヒダニ科には 14 属 34 種のダニが知られているが, 室内で発見されるのはこのうちヤケヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* とコナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae* の 2 種が主なものである^{30, 31)}。

ヒョウヒダニ類は他の無気門亜目のコナダニ類と同様に後胴体部に後胴体部腺 opisthonotal gland (油腺 oil gland) とよばれる分泌腺を持っており, ヤケヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* にはその分泌腺成分として geranial [(E)-3,7-dimethyl-2,6-octadeinal], neral [(Z)-3,7-dimethyl-2,6-octadeinal], 2-hydroxy-6-methylaldehyde, neryl formate, geranyl formate, pentadecane, (Z)-8-heptadecene, (Z, Z)-6,9-heptadecadiene がすでに同定されている¹⁴⁾。しかし, これらの化合物に警報フェロモンや集合フェロモンとしての活性の無いことが報告されており¹⁴⁾, このダニの分泌物成分の生態学的機能は解明されていない。化学生態学的アプローチによって本種の生態の基礎的知見を得ることは, 衛生害虫として問題となっているヒョウヒダニ類の防除法開発に重要と考えられる。そこで, 本研究ではヤケヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* の分泌物成分の再検討を行い, 未同定であった化合物の構造決定を行った。

この未同定化合物を、ヤケヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* 虫体のヘキササン抽出物からシリカゲル・クロマトグラフィー、分取 TLC により単離し、GC/MS、GC/FT-IR、¹H-NMRによりその構造を推定し、合成によってその構造を確認した。この未同定化合物は非常にユニークな構造を持つサリチルアルデヒド類縁体であった³²⁾。これらの結果について以下に詳述する。

2. 材料および方法

(1) 供試ダニとその飼育法

ヤケヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) は I. 2. (1) に示した飼育容器で飼育を行った。飼育容器は、底に1.2cm の高さに飽和 NaCl 水溶液を入れた密閉容器の中に入れ、容器内がたえず湿度約 75% になるようにした。さらに、この密閉容器は 25℃ に調節された 24 時間暗条件の昆虫飼育室の中に置いた。にほし粉と乾燥酵母の 1:1 混合物を飼料として、1 週間に 2 回、ダニの生育状況に応じて適当量与えた。必要に応じて飼育容器の数を増やし、大量飼育を行った。約 1 ヶ月飼育すると飼育培地の表面はダニで飽和状態になるので、ダニ虫体の抽出を行った。1 つの腰高シャーレで 6-7g のダニを飼育することできた。

(2) 抽出法

I. 2. (2) に示した方法により、飼育培地よりヤケヒョウヒダニ虫体のみを分離し、分泌成分の抽出を行った。得られた抽出物を用いて未同定の化合物の単離、精製を行った。

(3) 未同定化合物の精製、構造決定に用いた分析法および使用機器

・カラム・クロマトグラフ法

カラム・クロマトグラフ法にはシリカゲル (WAKOGEL C-200, 和光純薬) 2g を充填剤として用い、常法に従ってヘキサンでスラリーとして充填した (カラム内径10mm ×高さ 50mm)。溶出法は段階的溶出法を用い、展開溶媒はヘキサン、エーテル含有ヘキサン溶液 (ヘキサン:エーテル=97:3, 95:5, 90:10, 80:20, 50:50), およびエーテルで各 20ml ずつ順次溶出した。

・分取 TLC 法

分取 TLC 法は分析用シリカゲル TLC プレート (precoated silica gel 60 HF254, 5cm × 25cm, thickness 0.25mm, E. Merk) を用い, 展開溶媒としてヘキサン:エーテル (95:5) の混合溶媒を用いた。展開後, TLC プレートを風乾し, UV (254nm) を照射して, 吸収の見えるバンドをスパチュラで注意深くかき取り集めた。集めたシリカゲルは脱脂綿の小球で栓をした市販のパスツールピペット (内径 6mm × 全長130mm, 岩城硝子社製) へ移し, ヘキサン:エーテル (1:1) の混合溶媒 5ml で吸着した化合物を溶出した。溶出液を減圧下, 溶媒を留去し精製化合物を得た。

・ガスクロマトグラフ法

HP5890 series II 型ガスクロマトグラフに CP-Sil 19CB キャピラリー・カラム (0.22mm × 25m, Chrompack) を装備し, 135℃ から 250℃ まで毎分 4℃ で昇温させる昇温分析法で分析を行った。試料の注入にはスプリット方式 (分割比 100:1) を採用した。注入口および検出器の温度は 250℃ に設定した。検出器は水素炎イオン化検出器を用い, クロマトグラムはインテグレーター (HP2800) で出力し, 組成比および保持時間を記録した。保持時間は溶媒の保持時間を 0 分とする修正保持時間 (t_R') として表した。

・質量分析, 核磁気共鳴吸収スペクトル分析, 赤外吸収スペクトル分析は, I. 2. (4) に示した装置および方法で行った。

3. 未同定化合物の構造決定

(1) 未同定化合物の単離

先に述べた方法で飼育した容器 10 個から合計 64g のヤケヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* 虫体を得た。この虫体を 3 分間ヘキサンで抽出した。ヘキサン抽出液は減圧下に濃縮し、粗抽出物 150mg を得た。この粗抽出物をガスクロマトグラフィー分析に供した。

得られたガスクロマトグラフを図 30 に示す。その結果、8 成分のピークを認めた。このうちの 7 成分に関してはすでに同定されており、ガスクロマトグラフの保持時間および GC/MS 分析の結果を比較して A : nerol (3.8%), B : neryl formate (21.1%), C : neral (1.9%), D : geranyl formate 4.4%), E : geranial (37.7%), F : tetradecane (2.7%), H : (Z,Z)-6,9-heptadecadiene, (Z)-8-heptadecene (23.3%) と確認することが出来た (カッコ内は存在比)。本研究では未同定である G (5.1%, t_R' 6.85min) に注目し、単離、精製を行い、その構造の検討を行った。

図 31 に示すように、シリカゲル・カラム・クロマトグラフィーによりヘキサン粗抽出物(150mg) の分画を行った。溶媒系はエーテル含有ヘキサン溶液を用い、段階的溶出法により溶出した(ヘキサン：エーテル=100：0, 97：3, 95：5, 90：10, 80：20, 50：50, 0：100)。各画分の収量はヘキサン画分が 30.2mg, 97：3 画分が 76.7mg, 95：5 画分が 70.6mg, 90：10 画分が 22.4mg, 80：20 画分が 13.5mg, 50：50 画分が 7.6mg, エーテル画分が 8.7mg となった。

各溶出液についてそれぞれガスクロマトグラフ分析を行ったところ、G はヘキサン：エーテル= 90：10 画分にのみ溶出していた。さらにこの画分 22.4mg を分取 TLC 法により精製を行った。この際、吸着剤としてシリカゲル、展開溶媒としてヘキサン：エーテル= 95：5 の混合溶媒を用いた。

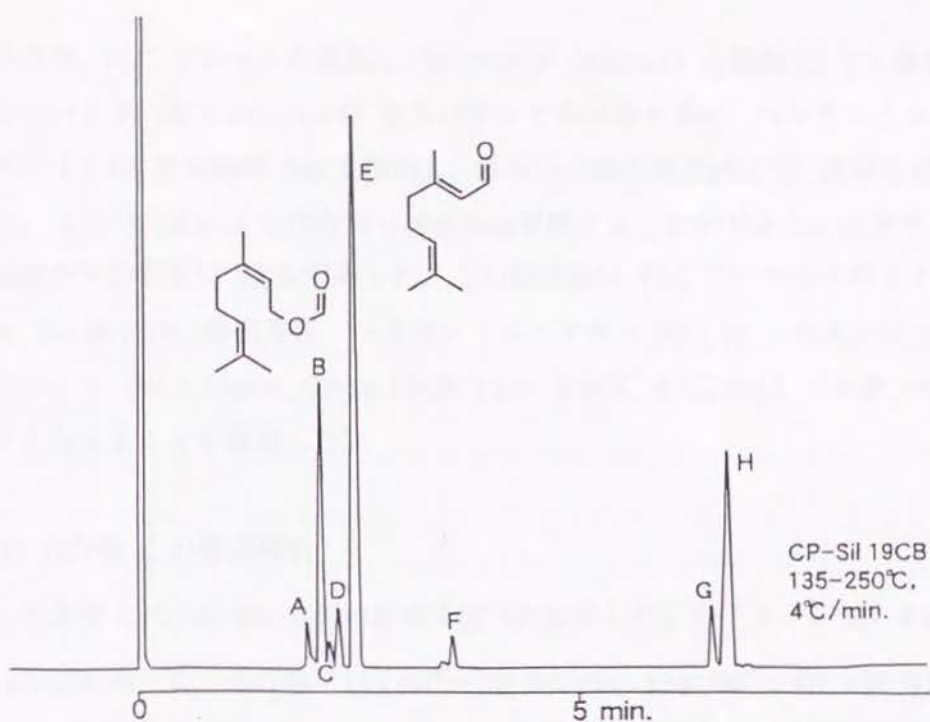


図30 ヤケヒョウヒダニ ヘキサン抽出物のガスクロマグラム

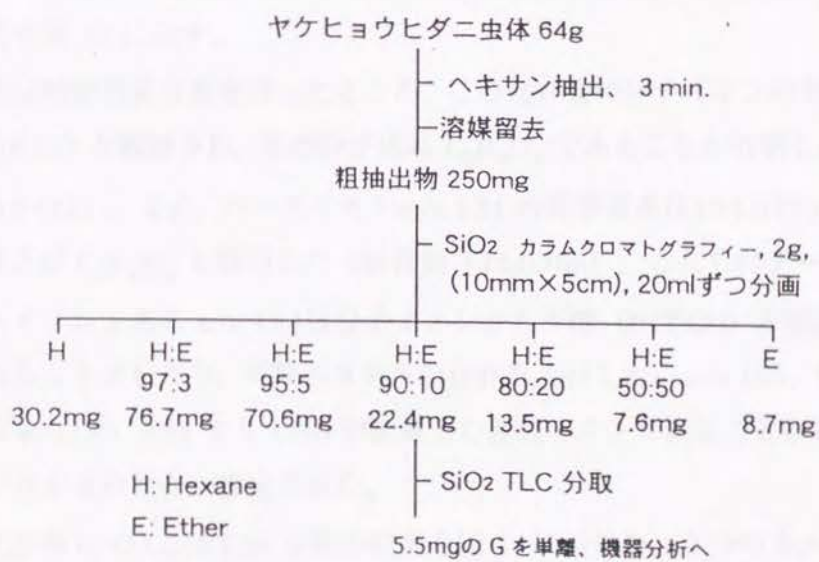


図31 化合物 G の精製法

展開後、TLC プレートを風乾し、UVランプ (254nm) を照射し、UV 吸収のあるバンド (R_f 0.24–0.26) をスパテルでかき取り集め、ヘキサン：エーテル = 1：1 の混合溶媒 5ml で抽出し、得られた抽出液を減圧下、溶媒を留去した。以上の方法により化合物 G を 5.5mg 単離することができた。ヘキサン粗抽出からの収率は 3.7% であった。この抽出物は TLC で一つのスポットを与え (R_f 値 0.25, 展開溶媒 ヘキサン：エーテル = 95：5), ガスクロマトグラフィー (t_R 6.85min, CP-Sil 19CB, 135–250°C, 4 °C/min) でも単一のピークを与えることを確認した。

(2) 化合物 G の構造解析

化合物 G の GC/MS 分析の結果を図 32 に示した。分子イオン M^+ を m/z 180 (23.9%) に、その他 151 ($M^+ - 29$, 23.9%), 134 ($M^+ - 46$, 100%) 105 (41.1%), 77 (67.4%), 78 (66.9%) に特徴的な開裂イオンを示した。ベースイオン (m/z 134) は分子イオンより 46 質量数が脱離しており、これはギ酸エステルに特徴的な脱離により生成した開裂イオンと考えられた。その開裂様式を図 33 に示す。

高分解能質量分析を行ったところ、この化合物の分子イオンの精密質量は 180.0427 と観測され、その分子式は $C_9H_8O_4$ であることが判明した (計算値 180.0422)。また、ベースイオン m/z 134 の精密質量は 134.0375 となり、組成式は $C_8H_6O_2$ と判明した (計算値 134.0368)。これらのデータから、ベースイオンである m/z 134 は分子イオンからギ酸 ($HCOOH$) が脱離したものであることがわかり、ギ酸エステルの存在を支持した。 m/z 151, 105 はそれぞれ m/z 180, 134 より CHO が脱離した開裂イオンであることがわかり、アルデヒド基の存在が推定された。

化合物 G の GC/FT-IR 分析の結果を図 34 に示した。2 つのカルボニル基 ($1750, 1670\text{cm}^{-1}$) と C-O 単結合 (1153cm^{-1}) の吸収が観測された。質量分析の結果を考え合わせると、これらの吸収はギ酸エステル ($\nu_{C=O}$,

1750cm^{-1} ; $\nu\text{C=O}$, 1153cm^{-1}) と芳香族アルデヒド ($\nu\text{C=O}$, 1670cm^{-1}) に由来するものと考えられた。

化合物 G を $^1\text{H-NMR}$ (500MHz , CDCl_3) 分析し、得られたスペクトルを図 35 に示した。 δ 11.91 (1H, s) と δ 10.31 (1H, s) はそれぞれ分子内水素結合したフェノール性水酸基とベンズアルデヒドのプロトンと帰属できた。 δ 5.48 (2H, s) は benzyl formate 構造のメチレン、 δ 8.12 (1H, s) はギ酸エステルのホルミルプロトンと帰属できた。また、 δ 7.5–6.0 付近にベンゼン環上の 3 個の水素と推定される以下の化学シフトが観測され [δ 7.50 (1H, dd, $J=8.51, 7.35\text{Hz}$), 7.02 (1H, d, $J=8.51\text{Hz}$), 6.98 (1H, d, $J=7.35\text{Hz}$)] カップリングパターンの解析から、この化合物は 1,2,3-三置換ベンゼンの構造を持つことが判明した。各ケミカルシフトの帰属を図 36 に示す。

以上の分析結果を考慮し、化合物 G の構造を 2-formyl-3-hydroxybenzyl formate と推定した。2-formyl-3-hydroxybenzyl formate を合成し、化合物 G と GC/MS, GC/FT-IR, $^1\text{H-NMR}$ とのスペクトルの比較を行った。その結果、すべて一致したので化合物 G は 2-formyl-3-hydroxybenzyl formate (17) と同定することができた。

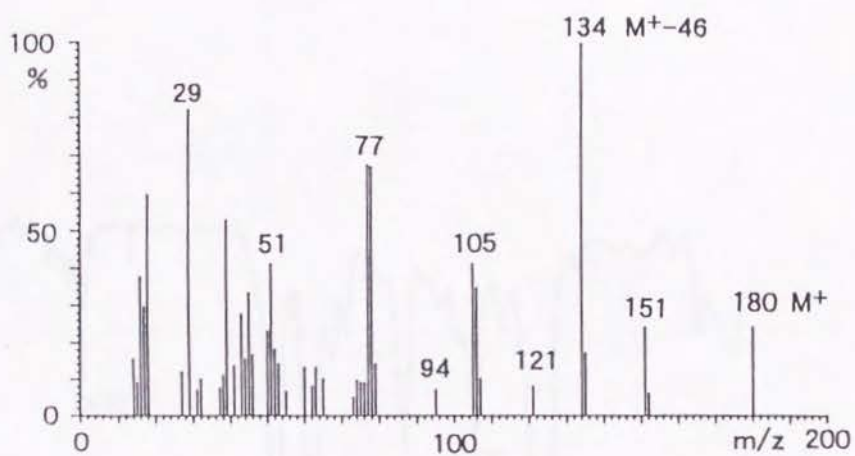


図 3 2 化合物 G の GC/MS スペクトル

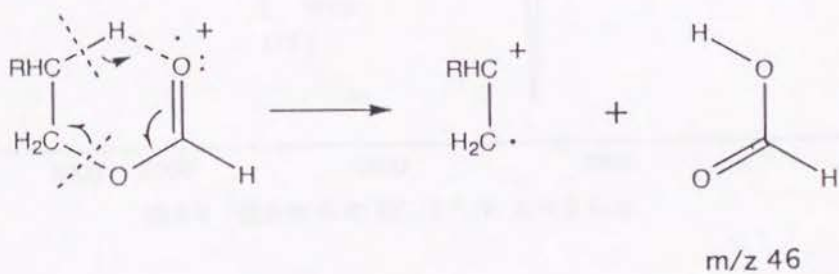


図33 rearrangement によるギ酸エステルの開裂様式

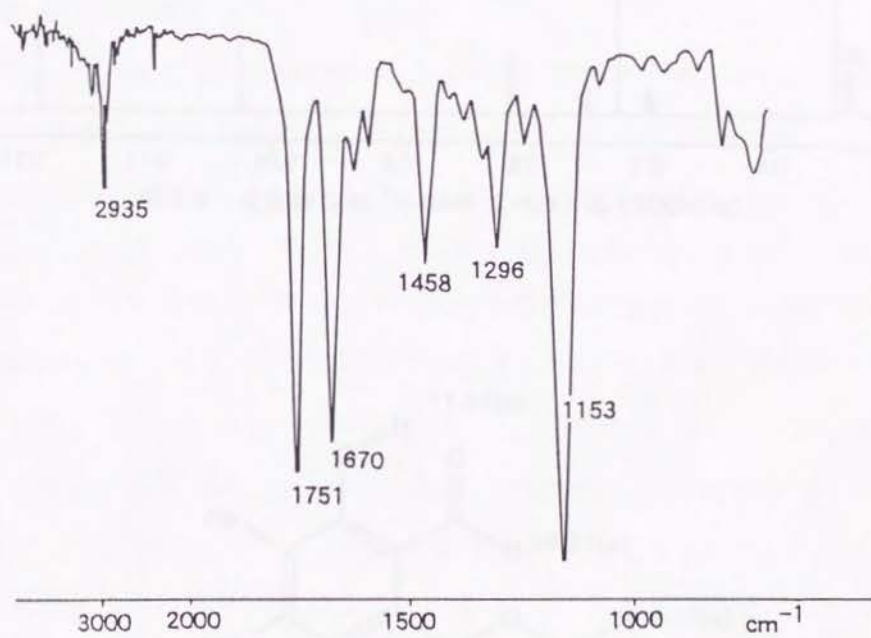


図 3 4 化合物 G の GC/FT-IR スペクトル

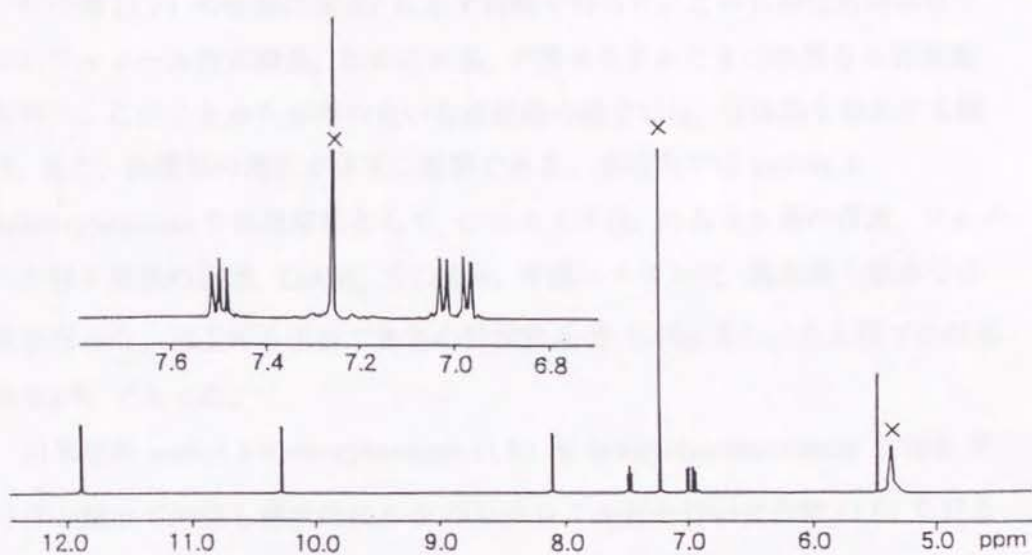
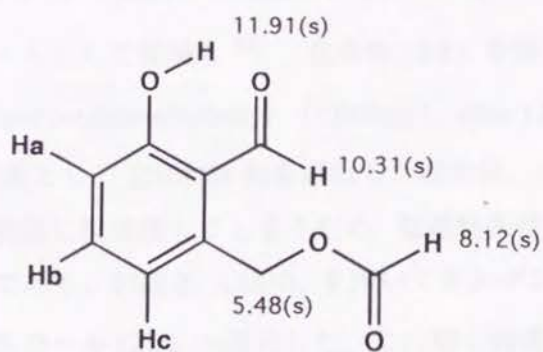


図 3 5 化合物 G の ^1H -NMR スペクトル (500MHz)



Hb : 7.50(dd, $J=8.51, 7.35\text{Hz}$)

Ha, Hc : 7.02(1H, d, $J=8.51\text{Hz}$), 6.98(1H, d, $J=7.35\text{Hz}$)

図36 化合物 (17) の ^1H -NMRスペクトル (500MHz) の帰属

4. 2-formyl-3-hydroxybenzyl formate の合成

化合物 (17) の合成は図 37 に示す経路で行った。この目的化合物は分子中にフェノール性水酸基, ホルミル基, ギ酸エステルと 3 つの異なる官能基を持つ。このことから効率の良い合成経路の確立には, 官能基を導入する順序, また, 保護基の選択が非常に重要である。本研究では methyl 3-hydroxybenzoate を出発原料として, C-ホルミル化, ホルミル基の保護, フェノール性水酸基の保護, LiAlH_4 での還元, ギ酸エステル化, 脱保護の順序で合成を行った。以上の 6 工程で無色の針状結晶を 1.70g 得た。全工程での収率は 0.6% であった。

出発原料 methyl 3-hydroxybenzoate (18) を hexametylenetetramine と 75% ポリリン酸中で加熱し選択的に 6 位の C-ホルミル化を行い化合物 (19) を得た³³⁾。このとき原料の 2 位が C-ホルミル化された methyl 2-formyl-4-hydroxybenzoate が副生成物として得られたが, 極性の違いからシリカゲルを充填剤としたカラム・クロマトグラフ法で容易に分離することが出来た。montmorillonite clay K-10 を触媒とした温和な条件で, 導入できたホルミル基をジメチルアセタールとして保護し³⁴⁾, 化合物 (20) を得た。続いてフェノール性水酸基を *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMSi) ether (21) として保護した^{35, 36)}。保護基として TBDMSi 基を選択した理由は, ジメチルアセタールが酸性条件下で容易に脱保護してしまうため, 塩基性条件下で反応を行う必要があったためである。引続き, LiAlH_4 を用いてカルボン酸メチルエステル部をベンジルアルコール (22) へ還元した。この際も通常, 酸性で行う後処理を塩基性条件下で行った。化合物 (22) をピリジン溶液中で acetic formic anhydride によりギ酸エステル化し, 化合物 (23) を得た³⁷⁾。最後に tetrabutylammonium fluoride (BuN^+F^-) を用いて TBDMSi エーテルをフェノール性水酸基へ脱保護し, 反応液を 2N 塩酸で洗浄することでジメチルアセタールをホルミル基へ脱保護し, 化合物 (17) を得た。

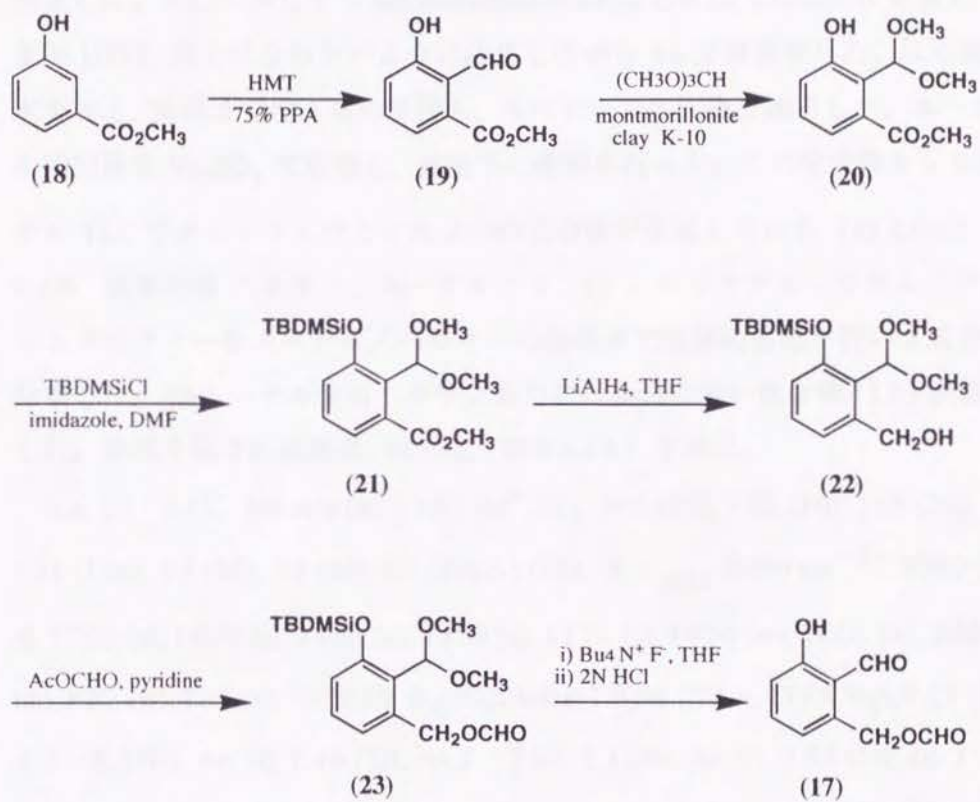


図37 2-formyl-3-hydroxybenzyl formate (17) の合成法

実験の部

methyl 2-formyl-3-hydroxybenzoate (19)

methyl 3-hydroxybenzoate (18) (60.0g, 395mmol) の 75% ポリリン酸 (300ml) 溶液をメカニカルスターラーで攪拌しながらオイルバスで 100℃ に加温した。そこへ少しずつ hexametylenetetramine (32.2g, 230mmol) を加え、温度が 100℃ 以上にならないように注意しながら 45 分間攪拌した。反応液に水を加え、室温まで冷えるのを待ち、エーテルで生成物を抽出した。エーテル抽出液を Na_2SO_4 で乾燥し、減圧下に濃縮を行った。この生成物をシリカゲル TLC でチェックしたところ 2 つの化合物が生成していた (R_f 0.56 と 0.46, 展開溶媒 ヘキサン：エーテル = 1：1)。シリカゲル・カラム・クロマトグラフィーをエーテル／ヘキサンの溶媒系で段階的溶出を行い 2 成分を分離した。3%エーテル含有ヘキサン画分には極性の低い化合物 (19) が溶出した。溶媒を除き針状結晶 (2.40g, 収率3.4%) を得た。

m.p. 53–54℃. MS m/z (%) : 180 (M^+ , 51), 165 (70), 152 (16), 149 (36), 121 (100), 93 (46), 92 (40), 65 (70), 53 (20). IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 2960 (br. s), 1700 (s), 1620 (s), 1450 (s), 1290 (s), 1175 (s), 1070 (w), 1005 (m), 905 (m), 829 (w), 755 (s). $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500MHz) : 3.96 (3H, s, COOCH_3), 7.17 (1H, d, $J = 8.37\text{Hz}$, Ar. H), 7.48 (1H, dd, $J = 7.91, 1.15\text{Hz}$, Ar. H), 7.54 (1H, dd, $J = 8.37, 7.91\text{Hz}$, Ar. H), 10.64 (1H, s, Ar.-CHO), 12.20 (1H, s, Ar.-OH). $^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (125.8MHz) : 52.68 (COOCH_3), 118.37 (Ar. C), 122.27 (Ar. C), 122.59 (Ar. C), 133.59 (Ar. C), 135.89 (Ar. C), 163.19 (Ar. C), 166.33 (COOCH_3), 197.45 (Ar.-CHO).

極性の高い副成分 *methyl 2-formyl-4-hydroxybenzoate* は 5%エーテル含有ヘキサン画分に溶出した。溶媒を除き針状結晶を得た (0.22g, 収率0.3%) 。
m.p. 132–133℃. MS m/z (%) : 180 (M^+ , 85), 179 (40), 162 (10), 149 (100), 136 (7), 121 (29), 93 (6), 75 (8), 65 (80), 53 (23). IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} :

3220 (br. s), 3020 (w), 2970 (w), 2880 (m), 1720 (s), 1660 (s), 1560 (m), 1490 (m), 1430 (m), 1380 (m), 1300 (s), 1220 (s), 1170 (s), 1085 (m), 980 (m), 885 (m), 810 (m), 750 (s), 700 (s). $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500MHz) : 3.95 (3H, s, COOCH_3), 7.65 (2H, d, $J = 7.39\text{Hz}$, Ar. H), 7.66 (1H, s, Ar. H), 9.99 (1H, s, Ar.-OH), 10.94 (1H, s, Ar.-CHO). $^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (125.8MHz) : 52.68 (COOCH_3), 119.14 (Ar. C), 120.43 (Ar. C), 122.91 (Ar. C), 133.64 (Ar. C), 137.35 (Ar. C), 161.28 (Ar. C), 165.70 (Ar. C), 196.46 (COOCH_3).

methyl 2-dimethoxymethyl-3-hydroxybenzoate (20)

montmorillonite clay K-10(10g, Aldrich Chem. Co.) を オルトギ酸メチル (50ml) に加え、室温で 30分間攪拌する。ろ過をして得られた粘土状の montmorillonite clay を (19) (2.4g, 13.3mmol) の溶液 (ヘキサン100ml, 塩化メチレン20mlの混合溶媒) に加えた。この溶液を室温で 4 時間攪拌し、TLC で原料が残っていないことを確認した後、ろ過して、montmorillonite clay を除いた。反応液は飽和 NaHCO_3 水溶液と飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を減圧下で除き、無色液体 (20) を得た (3.01g, 99.8%)。

Rf 0.45 (展開溶媒ヘキサン : エーテル = 1 : 1). IR ν_{max} (film) cm^{-1} : 3310 (br. s), 2955 (s), 2850 (w), 1725 (s), 1610 (m), 1585(m), 1455 (m), 1355 (w), 1275 (s), 1195 (m), 1165 (w), 1140 (m), 1095 (m), 1050 (m), 950(m), 760(m). $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (100MHz) : 3.46 (6H, s, OCH_3), 3.88 (3H, s, COOCH_3), 6.31 (1H, s, $\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$), 6.98-7.36 (3H, m, Ar. H), 8.89 (1H, s, Ar.-OH). $^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (25MHz) : 52.24 (COOCH_3), 54.52 (OCH_3), 103.73 ($\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$), 120.81 (Ar. H), 121.28 (Ar. H), 121.57 (Ar. H), 129.76 (Ar. H), 131.16 (Ar. H), 157.14 (Ar. H), 167.96 (COOCH_3).

methyl 3-[(tert-butyldimethylsilyl)oxy]-2-dimethoxymethylbenzoate (21)

化合物 (20) と imidazole (2.27g, 33.3mmol) の無水 DMF 溶液 (5ml) に *tert*-butyldimethylchlorosilane (2.40g, 16mmol) を加え、室温で4時間攪拌した。反応液にヘキサンを加え、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶媒を減圧下で除いて得られた粗生成物 (4.6g) をフロリジル・カラム・クロマトグラフィー (溶媒：5%, 10% エーテル含有ヘキサン) で精製し、無色液体 (21) を得た (2.40g, 54.6%)。Rf 0.24 (展開溶媒ヘキサン：エーテル = 5：1)。IR ν_{max} (film) cm^{-1} : 2950 (s), 2870 (w), 1725 (s), 1585 (s), 1450 (s), 1370 (m), 1290 (s), 1255 (m), 1195 (m), 1140 (m), 1105 (m), 1070 (m), 1025 (m), 975 (m), 940 (m), 835 (s). $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500MHz) : 0.25 (6H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 1.02 (9H, s, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 3.37 (6H, s, OCH_3), 3.86 (3H, s, COOCH_3), 5.55 (1H, s, $\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$), 6.87 (1H, dd, $J = 8.32, 0.91\text{Hz}$, Ar. H), 6.96 (1H, dd, $J = 7.74, 0.81\text{Hz}$, Ar. H), 7.21 (1H, dd, $J = 8.32, 7.74\text{Hz}$, Ar. H). $^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (25MHz) : -4.15 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 18.31 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 25.74 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 52.13 (COOCH_3), 55.23 (OCH_3), 101.21 ($\text{CH}(\text{OCH}_3)_2$), 120.28 (Ar. C), 126.37 (Ar. C), 129.35 (Ar. C), 134.21 (Ar. C), 154.04 (Ar. C), 170.54 (COOCH_3).

methyl 3-[(tert-butyldimethylsilyl)oxy]-2-dimethoxymethylbenzylalcohol (22)

氷冷した乾燥THF(50ml)を攪拌しながら、 LiAlH_4 (0.27g, 7mmol) を加えスラリーを作り、そのスラリーに化合物 (21) を滴下した。0℃で一時間攪拌した後、反応液を氷水に注ぎ、生成物をエーテルで抽出した。エーテル層を2N NaOH 水溶液と飽和食塩水で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。エーテルを減圧下に除き、得られた粗生成物をフロリジル・カラム・クロマトグラフィー (溶媒：エーテル) で精製し、無色油状物質 (22) を得た (1.80g, 81.7%)。IR ν_{max} (film) cm^{-1} : 3400 (br. s), 2950 (s), 2870 (w), 1580 (m), 1460 (s), 1380 (m), 1250 (s), 1210 (w), 1100 (w), 1065 (m), 1005 (m), 955 (m), 885 (m), 825 (m), 780 (m).

methyl 3-[(tert-butyldimethylsilyl)oxy]-2-dimethoxymethylbenzyl formate (23)

化合物(22)の乾燥ピリジン溶液に acetic formic anhydride を滴下した。室温で12時間攪拌後、反応液を氷水に注ぎ、エーテルで生成物を抽出した。エーテル層を順次飽和 NaHCO₃ 水溶液、2N HCl、飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄ で乾燥した。減圧下、エーテルを除き得られた残さ(2.25g)をフロリジル・カラム・クロマトグラフィーにより精製し、無色油状物質(23)を得た(1.70g, 86.2%)。Rf 0.41 (展開溶媒ヘキサン；エーテル=3：1)。IR ν_{\max} (film) cm^{-1} : 2950 (s), 2870 (w), 1720 (s), 1585 (m), 1460 (m), 1375 (m), 1280 (s), 1255 (s), 1165 (s), 1100 (w), 1070 (s), 955 (m), 875 (m), 835 (m), 780 (m). ¹H-NMR δ_{H} (100MHz): 0.25 (6H, s, Si(CH₃)₂), 1.03 (9H, s, SiC(CH₃)₃), 3.40 (6H, s, OCH₃), 5.55 (1H, s, CH(OCH₃)₂), 5.76 (2H, s, CH₂OCHO), 6.72-7.27 (3H, m, Ar. H), 8.18 (1H, s, CH₂OCHO). ¹³C-NMR δ_{C} (25MHz): -4.21 (Si(CH₃)₂), 18.31 (SiC(CH₃)₃), 25.80 (SiC(CH₃)₃), 55.58 (OCH₃), 63.18 (CH₂OCHO), 101.79 (CH(OCH₃)₂), 118.23 (Ar. C), 121.98 (Ar. C), 127.01 (Ar. C), 129.35 (Ar. C), 136.55 (Ar. C), 153.63 (Ar. C), 161.00 (CH₂OCHO).

2-formyl-3-hydroxybenzyl formate (17)

化合物(23)の無水 THF 溶液に tetrabutylammonium fluoride (1.0M THF 溶液, 5ml, 5mmol) を滴下した。室温でさらに30分間攪拌後、2N HClを加え、生成物をエーテルで抽出した。得られたエーテル層を 2N HCl と飽和食塩水で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。溶媒を減圧下で除いて得られた粗生成物(0.34g)をシリカゲル・カラム・クロマトグラフィー (溶媒：10%エーテル含有ヘキサン) で精製し、無色針状結晶(17)を得た(0.12g, 37.0%)。

m.p. 59°C. MS m/z (%): 180 (M⁺, 34), 152 (8), 151 (34), 135 (16), 134 (100), 121 (6), 107 (9), 106 (49), 105 (44), 95 (8), 79 (14), 78 (55), 77 (55), 65 (12), 62 (7), 55 (8), 53 (10), 52 (15), 51 (36), 50 (12), 41 (6), 39 (34), 29

(34). IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 2930 (br. s), 1710 (s), 1660 (s), 1615 (w), 1570 (w), 1445 (m), 1365 (m), 1315 (w), 1285 (m), 1175 (s), 1155 (s), 1065 (w), 945 (w), 920 (m), 850 (w), 775 (s), 720 (s). $^1\text{H-NMR}$ δ_{H} (500MHz) : 5.48 (2H, s, CH_2CHO), 6.98 (1H, d, $J = 7.35\text{Hz}$, Ar. H), 7.02 (1H, d, $J = 8.51\text{Hz}$, Ar. H), 7.50 (1H, dd, $J = 8.51, 7.35\text{Hz}$, Ar. H), 8.12 (1H, s, CH_2CHO), 10.31 (1H, s, Ar.-CHO), 11.92 (1H, s, Ar.-OH). $^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (125.8MHz) : 62.10 (CH_2CHO), 117.83 (Ar. C), 119.64 (Ar. C), 121.80 (Ar. C), 137.80 (Ar. C), 160.05 (CH_2CHO), 163.51 (Ar. C), 194.71 (Ar. C). Anal. Calcd. for $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$: C, 59.98; H, 4.48%. Found : C, 60.06; H, 4.56%.

5. 考察

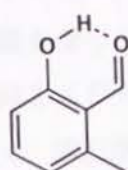
コナダニ類の分泌成分には、3種類のサリチルアルデヒド類縁体が同定されている。オオケナガコナダニ *Tyrophagus perniciosus*¹⁸⁾、ムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus*⁸⁾、オソアシブトコナダニ *Acarus immobilis*⁹⁾、コナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae*¹⁴⁾、ケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae*¹⁵⁾、*Caloglyphus rodriguezi*¹⁷⁾、アシブトコナダニ *Acarus siro*¹⁶⁾ の7種から同定された 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde (5)、ロビンネダニ *Rhizoglyphus robini* から同定された hexyl 2-formyl-3-hydroxy benzoate (24)³⁸⁾、*Caloglyphus* sp. から同定された methyl 2-formyl-3-hydroxy benzoate (25)³⁹⁾ である。このうち化合物 (24)、(25) は最初に同定されたロビンネダニの学名にちなんで、それぞれ hexyl rhizoglyphinate, methyl rhizoglyphinate と命名されている。本研究でヤケヒョウヒダニから同定した 2-formyl-3-hydroxybenzyl formate (17) を、この rhizoglyphic acid がアルコールに還元された母核を持つギ酸エステルであることから、rhizoglyphinyl formate と命名した。

このうち2つのリゾグリフィン酸エステル (24)、(25) は強い抗カビ活性を持つことが報告されている³⁸⁾。湿度が高く微生物の繁殖しやすい環境で生息するコナダニにとって、これらサリチルアルデヒド類縁体は微生物に対する防御物質としての機能を持つと考えられる。

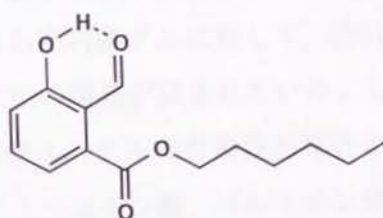
また、これらサリチルアルデヒド類縁体のなかで化合物 (5) はオオケナガコナダニ *Tyrophagus perniciosus* の警報フェロモン¹⁸⁾、ムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus*、オソアシブトコナダニ *Acarus immobilis* の性フェロモン^{8,9)} として同定されている。これらの物質はもともと上で述べたように防御物質として機能していたが、進化の過程でフェロモンとしての機能を持つようになったと考えられる。コナダニ類ではこのような2つの機能を持つ分泌成分が他にも見つかり、ケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae*

などが持つ citral (neral, geranial の混合物)⁴⁰⁾, *Caloglyphus pollyphilae* の持つ β -acaridial (26)⁴¹⁾ はともに強い抗カビ活性を持っているが、それぞれ、警報フェロモン、性フェロモンの機能も持つことが分かっている。本研究で同定された化合物 (17) もその構造から抗菌活性を持つことが考えられるが、情報伝達物質としての機能を有している可能性も考えられる。

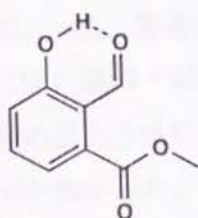
これらコナダニ類由来のサリチルアルデヒド類縁体はすべてその 6 位が置換されている。またその置換基もメチル基、カルボン酸のメチルエステル、カルボン酸のヘキシルエステル、アルコールのギ酸エステルと多様性に富んでおり、その生合成経路を考える上で非常に興味深い。6 位が置換されたこれらユニークなサリチルアルデヒド類縁体はコナダニに比較的幅広く見つかるが、昆虫では現在までカミキリの一種 *Phoracantha semipunctata* の後胸腺分泌物として化合物 (5) が同定されているだけである⁴²⁾。しかし、化合物 (5) と生合成的に非常に近い位置にあると考えられる 6-メチルサリチル酸のメチルエステル (27) はオサムシの一種 *Dyschirius bonelli* の分泌物質⁴³⁾、アリの大顎腺分泌物⁴⁴⁾として同定されている。また、コクヌストの一種 *Chrysopeplus expositus* では化合物 (27) と共にエチル基を持つ化合物 (28) が同定されている⁴⁵⁾。



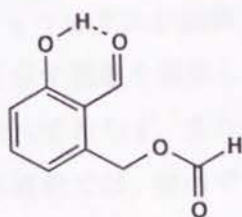
(5)



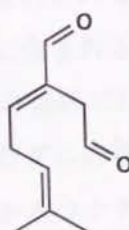
(24)



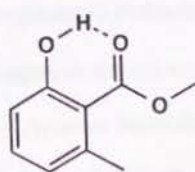
(25)



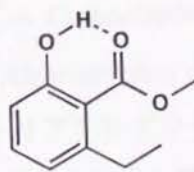
(18)



(26)



(27)



(28)

Ⅲ. コナダニ類における脂肪酸とそのメチルエステルの食餌誘引・定着活性

1. 緒言

近年、建築技術の進歩に伴う住居の高い密閉性、エアコンの普及およびカーペット類の敷設等により、ダニ類の生息に好条件の環境が整えられ、室内でのダニの繁殖が問題となっている。これら室内塵ダニに対して、誘引物質を用いた効果的な駆除およびモニタリング法の開発が望まれている。しかし、その研究例は少なく、誘引剤として脂肪酸エステルの有効性が特許として報告されているのみである⁴⁶⁾。そこでは、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファリノレン酸、のメチルおよびエチルエステルに、室内に発生するダニが誘引されると報告している。一方、著者はコナヒョウヒダニが飼料（魚粉）に含まれる遊離の脂肪酸に強い誘引・定着活性を示す現象を発見した。前述の特許では、遊離の脂肪酸の誘引活性には全く触れておらず、また誘引されたダニの種についての指示が無かった。そこで本研究では、室内でよく見つかるコナダニ類8種（コナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae*、ヤケヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus*、コウノホシカダニ *Lardoglyphus konoi*、ケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae*、サトウダニ *Carpoglyphus lactis*、イエニクダニ *Glycyphagus domesticus*、ムギコナダニ *Aleuroglyphus ovatus*、オソアシブトコナダニ *Acarus immobilis*）を用いて、トリアシルグリセロールの主要な構成脂肪酸であるパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アルファリノレン酸とそのメチルエステルの誘引・定着活性の比較検討を行った。また、脂肪酸に誘引・定着活性の認められた3種（コナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae*、コウノホシカダニ *Lardoglyphus konoi*、ケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae*）を用いて、炭素数を7から20までの飽和脂肪酸を試験し、その活性の比較を行った。その結果、コナダニ類にはトリアシルグリセロールの主要な構成脂肪酸とそのメチルエステルに対して誘引・定着活性を示す種と、全く活性を示さない種が存在すること、遊離の脂肪酸とメチ

2. 材料と方法

(1) 供試したダニとその飼育法

以下に示す8種のコナダニ類を用いて、食餌誘引、定着物質の生物試験を行った。コナヒョウヒダニ *Dermatophagoides farinae* HUGHES [Pyroglyphidae], ヤケヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* (TROUSSART)

[Pyroglyphidae], コウノホシカダニ *Lardoglyphus kono* SASA et ASANUMA [Lardoglyphidae], ケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae* (SCHRANK)

[Acaridae: Acarinae], サトウダニ *Carpoglyphus lactis* (L.) [Carpoglyphidae],

イエニクダニ *Glycyphagus domesticus* DE GEER [Glyciphagidae], ムギコナ

ダニ *Aleuroglyphus ovatus* (TROUPEAU) [Acaridae: Acarinae], オソアシブ

トコナダニ *Acarus immobilis* GRIFFITHS [Acaridae: Acarinae]

飼育容器はガラス製の蓋のあるガラス製円筒容器 (内径 11cm, 高さ 7cm) を用いた。飼育容器は、底に1-2cm の高さに飽和塩類水溶液を入れた密閉容器の中に入れ、湿度を調節した。

ダニの飼料として以下のものをそれぞれ与えた。サトウダニ, 乾燥酵母: 精白糖 = 1 : 1 ; コナヒョウヒダニ, ヤケヒョウヒダニ, コウノホシカダニ, イエニクダニ, 乾燥酵母: 魚粉 = 1 : 1 ; ケナガコナダニ, ムギコナダニ, 乾燥酵母; オソアシブトコナダニ, 乾燥酵母: 全粒小麦粉 = 1 : 1。

飼育湿度は以下の湿度で行った (カッコ内は密閉容器の湿度を調節するために用いた飽和水溶液の塩)。サトウダニ, ヤケヒョウヒダニ, コウノホシカダニ, イエニクダニ, ケナガコナダニ, RH 約 75% (NaCl); コナヒョウヒダニ, RH 約 65% (NH_4NO_3); オソアシブトコナダニ, RH 約 85% (KCl)。

飼育容器を入れた密閉容器は暗黒条件, 25℃ (イエニクダニのみ18℃) に設定された恒温室に置き、飼育を行った。

(2) 生物試験法

体長 1 mm にも満たないコナダニの誘引・定着活性を試験するのは非常に困難である。そこで、これらの誘引・定着試験を迅速に行うために、飼育容器をそのまま生物試験容器として使用する簡便な生物試験法を開発した。これにより、同時に複数の試料の誘引・定着活性試験を数時間で行うことが可能となった。生物試験の方法を模式的に図 38 に示した。新しい飼育容器の蓋の内側に漉紙 (Advantec Toyo No. 2, 10cm dia.) を貼り付け、その漉紙に鉛筆で上下左右 2 cm ずつ離れるように直径 5 mm の円を 15 個書いた。その円内へマイクロシリンジを用いて、ヘキサシロリン酸溶液とした試料を $100\mu\text{g}$ 、 $10\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ の投与量になるように塗布した。この方法で同時に 5 種類の化合物を 3 種類の投与量で試験することが出来る。試験するダニの飼育容器にこの試験用の蓋を乗せ、暗黒下に 3 時間放置した。肉眼および実体顕微鏡下で試料を塗布した円内を観察し、ダニが集合、定着していれば活性あり、集合、定着していなければ活性なしとした。この生物試験を行う飼育容器は、ダニが容器内で飽和状態になっており、飼育容器の内側や蓋へ這い上がってきている状態のもののみを使用した。試験中の温度および湿度条件は、供試したダニの飼育中の条件と同じとした。

飼育容器のフタの裏に
ろ紙を貼り、試料を塗布。

試料を塗布した円内にダニ
が定着していれば、活性あり
とする。

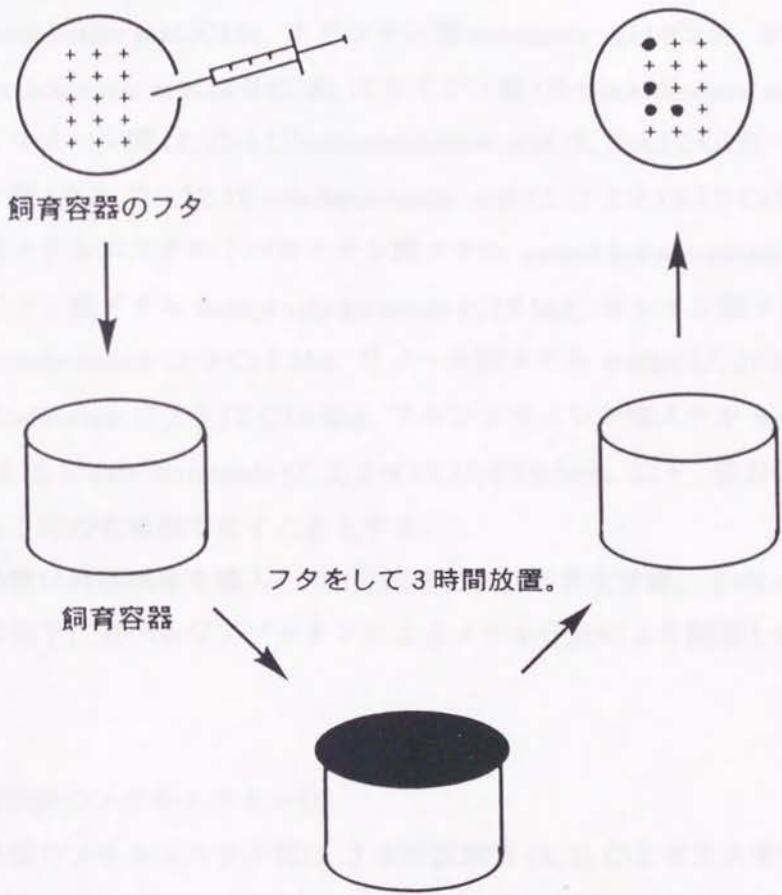


図 3 8 生物試験法の模式図

(3) 試験した化合物

以下の脂肪酸およびメチルエステルを試験した。

脂肪酸：ノナン酸 nonanoic acid (C9), デカン酸 decanoic acid (C10), ウンデカン酸 undecanoic acid (C11), ドデカン酸 dodecanoic acid (C12), トリデカン酸 tridecanoic acid (C13), ミリスチン酸 tetradecanoic acid (C14), ペンタデカン酸 pentadecanoic acid (C15), パルミチン酸 hexadecanoic acid (C16), ヘプタデカン酸 heptadecanoic acid (C17), ステアリン酸 octadecanoic acid (C18), ノナデカン酸 nonadecanoic acid (C19), エイコサン酸 eicosanoic acid (C20), オレイン酸 (*Z*)-9-octadecenoic acid (*Z*-9-C18), エライジン酸 (*E*)-9-octadecenoic acid (*E*-9-C18), リノール酸 (*Z, Z*)-9,12-octadecadienoic acid (*Z, Z*-9,12-C18), アルファリノレン酸 (*Z, Z, Z*)-9,12,15-octadecatrienoic acid (*Z, Z, Z*-9,12,15-C18)。

脂肪酸メチルエステル：パルミチン酸メチル methyl hexadecanoate (C16 Me), ステアリン酸メチル methyl octadecanoate (C18 Me), オレイン酸メチル methyl (*Z*)-9-octadecenoate (*Z*-9-C18 Me), リノール酸メチル methyl (*Z, Z*)-9,12-octadecadienoate (*Z, Z*-9,12-C18 Me), アルファリノレン酸メチル methyl (*Z, Z, Z*)-9,12,15-octadecatrienoate (*Z, Z, Z*-9,12,15-C18 Me)。以下、表および文中ではかっこ内の省略形で表すこととする。

脂肪酸は特級試薬を購入し (和光純薬および半井化学製), そのメチルエステルは以下に述べるジアゾメタンによるメチル化法により調製した。

(4) 脂肪酸のメチルエステル化

脂肪酸のメチルエステル化は 3 本の試験管 (A, B, C) をガラス管で連結した装置を用いてドラフト内で行った。試験管 A にはエーテル 5ml, 試験管 B には KOH 0.6g, 水 1 ml, エーテル 1 ml, カルビトール 3.5ml を, 試験管 C には脂肪酸 10mg, エーテル 5ml を入れた。全装置を連結した後, 試験管 B に *p*-toluenesulfonylmethylnitrosoamide (半井化学製) 0.1g を加えた。直ちにジアゾメタンが発生するので, 試験管 A に入れてあるエーテルを通じて試験管 B に

N₂ ガスを流し、試験管Cにジアゾメタンを送り込んだ。試験管Cの溶液が過剰のジアゾメタンで黄色になれば、脂肪酸はすべてメチルエステル化したと、考えて反応を終了し、反応液を減圧下、濃縮した。

3. 脂肪酸とそのメチルエステルの誘引、定着活性

トリアシルグリセロールの主要な構成脂肪酸である C16, C18, Z-9-C18, Z, Z-9,12-C18, Z, Z, Z-9,12,15-C18 とそのメチルエステル C16 Me, C18 Me, Z-9-C18 Me, Z, Z, Z-9,12,15-C18 Me の、コナダニ類 8 種 (コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、コオノホシカダニ、ケナガコナダニ、サトウダニ、オソアシブトコナダニ、ムギコナダニ、イエニクダニ) に対する誘引、定着活性を調べた。その結果を表 5 に示す。

コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、コオノホシカダニの 3 種は $100\mu\text{g}$ の投与量で、ケナガコナダニは $10\mu\text{g}$ の投与量で試験したすべての脂肪酸、相当するメチルエステルに誘引および定着活性を認めた。一方、それ以外の 4 種 (サトウダニ、ムギコナダニ、イエニクダニ、オソアシブトコナダニ) は試験した脂肪酸およびそのメチルエステルには誘引、定着を示さなかった。以上の結果から、コナダニ類にはトリアシルグリセロールの主要な構成脂肪酸とそのメチルエステルに対して誘引・定着活性を示す種と、全く活性を示さない種が存在することが判明した。この誘引・定着活性は脂肪酸の飽和、不飽和で差は無く、また酸とエステルでも活性の強さに差は無いことが判明した。また、オレイン酸の幾何異性体である E-9-C18 を上記の 8 種のコナダニで試験したところ、コナヒョウヒダニとヤケヒョウヒダニにのみ $100\mu\text{g}$ の投与量で活性を認め、他の 6 種 (コオノホシカダニ、ケナガコナダニ、サトウダニ、ムギコナダニ、イエニクダニ、オソアシブトコナダニ) では活性が認められなかった。Z-9-C18 に誘引・定着活性を示した 4 種のうち、コオノホシカダニ、ケナガコナダニはその幾何異性体である E-9-C18 には活性を示さなかった。この 2 種は幾何異性を識別していることが明らかになった。

脂肪酸に誘引・定着活性のあったコナダニ 4 種のうちの 3 種 (コナヒョウヒダニ、コオノホシカダニ、ケナガコナダニ) を用いて、炭素鎖の長さとの誘引、定着活性の関係を調べるため炭素数 7 から 20 までの 14 種の飽和脂肪酸の誘引・定着活性を試験した。投与量は $100\mu\text{g}$ とした。その結果を表 6 に示す。3 種のうちコナヒョウヒダニは 9 種の脂肪酸に活性をみとめ (C8, C9,

C10, C12, C13, C14, C15, C16, C18), 炭素鎖の長さに対して最も幅広い活性を示した。コウノホシカダニは炭素鎖の短い2種を含む6種類の脂肪酸(C9, C10, C14, C15, C16, C18)に活性をみとめた。ケナガコナダニは炭素数が14から19までの間の6種の脂肪酸にのみ活性を認めた。天然にはほとんど存在しないと考えられる炭素数が奇数の脂肪酸のうちC7, C11は試験した三種いずれも活性を示さなかった。しかし, C9はコナヒョウヒダニとコオノホシカダニに, C13はコナヒョウヒダニに, C17とC19はケナガコナダニに誘引, 定着活性を示した。以上の結果から, コナダニ類の脂肪酸に対する嗜好は種によって多様性があることが明らかになった。

表5 脂肪酸とそのメチルエステルの
食餌誘引, 定着試験の結果

脂肪酸と そのメチルエステル	試験したコナダニの種							
	DF	DP	LK	TP	CL	AI	AO	GD
C16	+	+	+	++	-	-	-	-
C16Me	+	+	+	++	-	-	-	-
C18	+	+	+	++	-	-	-	-
C18Me	+	+	+	++	-	-	-	-
Z-9-C18	+	+	+	++	-	-	-	-
Z-9-C18Me	+	+	+	++	-	-	-	-
E-9-C18	+	+	-	-	-	-	-	-
Z,Z-9,12-C18	+	+	+	++	-	-	-	-
Z,Z-9,12-C18Me	+	+	+	++	-	-	-	-
Z,Z,Z-9,12,15-C18	+	+	+	++	-	-	-	-
Z,Z,Z-9,12,15-C18Me	+	+	+	++	-	-	-	-
飼料	YF	YF	YF	Y	YS	YW	Y	YF

++ : 投与量10 μ gで活性あり, + : 投与量 100 μ gで活性あり,
- : 投与量100 μ gで活性なし

DF : コナヒョウヒダニ, DP : ヤケヒョウヒダニ, LK : コオノホシカダニ,
TP : ケナガコナダニ, CL : サトウダニ, AI : オソアシプトコナダニ,
AO : ムギコナダニ, GD : イエニクダニ

YF : 乾燥酵母と魚粉, Y : 乾燥酵母, YS : 乾燥酵母と砂糖,
YW : 乾燥酵母と小麦粉

表6 食餌誘引, 定着活性における脂肪酸
炭素鎖長の影響

試験した コナダニの種	飽和脂肪酸						
	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13
DF	-	+	+	+	-	+	+
LK	-	-	+	+	-	-	-
TP	-	-	-	-	-	-	-

試験した コナダニの種	飽和脂肪酸						
	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20
DF	+	+	+	-	+	-	-
LK	+	+	+	-	+	-	-
TP	+	+	+	+	+	+	-

+: 投与量100 μ gで活性あり, -: 投与量 100 μ gで活性なし

DF: コナヒョウヒダニ

LK: コオノホシカダニ

TP: ケナガコナダニ

4. 考察

化学的な刺激は食物選択において重要な役割を果たしていると考えられ、貯蔵食品害虫の防除を目的として様々な害虫の食餌誘引物質が調べられている。コナダニ類では、ケナガコナダニの食餌誘引物質として、2-heptanone, 2-octanone, 2-nonanone, 8-nonen-2-one, 2-undecanone, 2-tridecanone, 3-methylbutanol, *n*-hexanol, 2-nonanol, *n*-butanol, *n*-pentanol がチェダーチーズから^{48, 49)}, *cis*-octa-1,5-diene-3-ol, *trans*-octa-1,5-diene-3-ol が、数種のカビ⁵⁰⁾, マッシュルーム⁵¹⁾ から同定されている。その他, アミノ酸, トリアシルグリセロール, 脂肪酸, 糖, 糖アルコール, ビタミンなどの食餌誘引, 摂食刺激活性が調べられ, D-ribose, D-glucose, myristic acid などが活性を示すことが報告されている⁵²⁾。また, 糖分を多く含んだ食品に発生するサトウダニでは単糖, トリアシルグリセロール, 脂肪酸の誘引, 摂食活性が調べられ, 特に α -D-glucose に強い活性が認められている⁵³⁾。

しかし, 室内に発生するダニ類の誘引物質の研究例は少ない。唯一の例として, 脂肪酸のメチルおよびエチルエステルを誘引剤とした誘引基材が特許公報として公開されている⁴⁶⁾。この誘引基材は粘着性のトラップと共に使用され, その有効成分としてミリスチン酸, パルミチン酸, パルミトレイン酸, ステアリン酸, オレイン酸, リノール酸, アルファリノレン酸, ガンマリノレン酸のメチルおよびエチルエステルが報告されている。しかし, 遊離の脂肪酸の誘引活性については言及されていない。本研究での検討の結果から, 遊離の脂肪酸とその相当するメチルエステルとは同等の誘引活性を持つことが示された。また, この特許公報のなかでは, この誘引剤の効果は室内に発生するダニ全般にあるとして, 誘引されたダニの種については言及していない。しかし, 本研究の結果から, 実際には脂肪酸およびそのメチルエステルに全く誘引されないダニも存在することが明らかになった。

本研究で開発した生物試験法ではサトウダニはいかなる脂肪酸および脂肪酸メチルエステルに対しても誘引, 定着活性を示さなかった。しかし,

Pankiewicz-Nowicka らはサトウダニがオレイン酸、リノール酸などに対して 0.001-0.05M (オレイン酸として 0.28-1.4 g) の投与量で弱い食餌誘引、定着活性を示すことを報告している⁵³⁾。生物試験法が異なるため一概には比較できないが、本研究で得られた結果からサトウダニの脂肪酸に対する誘引・定着活性はコナヒョウヒダニやケナガコナダニでの結果 (それぞれ100 μ g と10 μ g で活性あり) と比較すると非常に弱いと言ってよい。また、サトウダニが α -D-glucose に強い活性を持つことから⁵³⁾、このダニの食物選択においては、脂肪酸よりも糖類が重要な役割を果たしていると考えられる。また、ケナガコナダニはミリスチン酸より低級の脂肪酸に対しては誘引活性を示さないことが報告されており⁵²⁾、この点については本結果と一致していた。ケナガコナダニには揮発性の食餌誘引物質として低級の不飽和アルコールやケトンが同定されているが、揮発性の脂肪酸には誘引されないことが確認された。

試験したダニの飼育に用いている飼料を表5に示した。乾燥酵母だけでは栄養的に不十分で生育が遅い種の飼料には、魚粉、小麦粉、砂糖などを加えている。脂肪酸に活性を認めた4種のうち、3種 (コナヒョウヒダニ、ヤケヒョウヒダニ、コオノホシカダニ) は脂質が豊富な魚粉を含む飼料で飼育している。しかし、活性のあったケナガコナダニは乾燥酵母のみで飼育できるので、脂質の豊富な餌を要求するコナダニ類がすべて脂肪酸に強い活性を持つわけではない。また、イエニクダニは魚粉を含む飼料を与えているが、脂肪酸やそのメチルエステルには活性を示さなかった。オソアシブトコナダニに与える小麦粉を含む飼料も多量のトリアシルグリセロールを含み、このダニも脂質を好むと考えられるが脂肪酸やそのメチルエステルには活性が認められなかった。コナダニ類の栄養的要求と脂肪酸の誘引・定着活性の相関を予想したが、本研究の結果からは完全に一致はしなかった。

ミツバチに寄生し、養蜂の深刻な害虫となるミツバチヘギイタダニ *Varrora jacobsoni* は寄主となるミツバチの幼虫が分泌する脂肪酸エステル、特にパルミチン酸メチルとリノール酸メチルに誘引される^{54, 55)}。また、ヒョウヒダニ類と同じヒゼンダニ亜科に属するヒゼンダニ *Sarcoptes scabiei* は炭素数 5-

20 の飽和、不飽和脂肪酸、脂肪酸メチルエステルに誘引されることが報告されている⁵⁶⁾。ヒゼンダニはヒトや家畜の皮膚に寄生し疥癬の原因となることが知られており、寄主動物の表皮由来の脂肪酸を寄主発見カイロモンとして利用している。このようにダニにとって脂肪酸およびその関連物質は食物や寄主の発見に重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究により、コナダニ類には脂肪酸とメチルエステルに強い誘引、定着活性を持つ種と持たない種が存在すること、その嗜好は種によって異なっていることが明らかになった。このような違いは、その種の生態 (特に食物選択) と密接に関連していると考えられ、非常に興味深い。

摘要

I. オソアシプトコナダニの2種の性フェロモン

オソアシプトコナダニ *Acarus immobilis* の雄にマウント行動を解発する雌分泌性の性フェロモンとして 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde (2,6-HMBD) を、雌を誘引する雄分泌性の性フェロモンとして、炭化水素混合物 (tridecane, pentadecane, heptadecane, (*Z*)-8-heptadecene, (*Z,Z*)-6,9-heptadecadiene, pentacosane, heptacosane, nonacosane) を同定した。

雄、雌、若虫のヘキサン抽出物のガスクロマトグラムの比較を行ったところ、2,6-HMBD は1個体あたり雄：雌：若虫=1.32：1.00：0.08 の量比で3者に存在し、雄分泌性の性フェロモンの成分と考えられる pentadecane, heptadecane, (*Z*)-8-heptadecene, (*Z,Z*)-6,9-heptadecadiene が雄のみに存在するという結果を得た。

オソアシプトコナダニ *Acarus immobilis* の配偶行動は、両性が持ち雄のみを性的に興奮させる雌分泌性の性フェロモンと、雄特有の成分と両性が持つ成分からなり、雌を誘引する雄分泌性の性フェロモンの2種類の性フェロモンが関与していることが判明した。

II. ヤケヒョウヒダニからの新規サリチルアルデヒド類縁体の同定

ヤケヒョウヒダニ *Dermatophagoides pteronyssinus* のヘキサン抽出物中より、新規なサリチルアルデヒド類縁体を 3.7% の収率で単離した。GC/FT-IR, GC/MS, ^1H -NMR の結果から、この化合物の構造を 2-formyl-3-hydroxybenzyl formate と推定し、合成によって確認した (慣用名 rhizoglyphinyl formate)。この化合物の合成は methyl 3-hydroxybenzoate を出発原料として、2位のホルミル化、ホルミル基とフェノール性水酸基の保護、 LiAlH_4 による還元、ギ酸エステル化、脱保護の6工程によって行った。

Ⅲ. コナダニ類における脂肪酸とそのメチルエステルの食餌誘引・定着活性

脂肪酸 (パルミチン酸, ステアリン酸, オレイン酸, リノール酸, アルファリノレン酸) とそれらのメチルエステルを 8 種のコナダニ類 (コナヒョウヒダニ, ヤケヒョウヒダニ, コウノホシカダニ, ケナガコナダニ, サトウダニ, イエニクダニ, ムギコナダニ, オソアシブトコナダニ) を用いて誘引, 定着活性を調べた。

コナヒョウヒダニ, ヤケヒョウヒダニ, コウノホシカダニ, ケナガコナダニの 4 種は脂肪酸とエステルのすべてに誘引活性を示したが, それ以外の 4 種は全く活性を示さず, 種により誘引, 定着活性が異なることを認めた。

活性を認めた 4 種のうちコナヒョウヒダニ, コウノホシカダニ, ケナガコナダニの 3 種をもちいて, C7-20 までの直鎖飽和脂肪酸と, オレイン酸の幾何異性体であるエライジン酸を試験し, 天然にほとんど存在しない偶数および奇数炭素の脂肪酸に対する誘引活性の有無も検討した。その結果, コナヒョウヒダニは C8-10, 12-16, 18 に活性を認め, 奇数の炭素鎖をもつ C9, 11, 17, 19 は不活性, コウノホシカダニは C9, 10, 14-16, 18 に活性を認め, それ以外は不活性, ケナガコナダニは C14-19 が活性で, それより低級の酸は不活性であった。また, エライジン酸はコナヒョウヒダニのみ活性で, 他の 2 種は不活性であった。コナダニ類における脂肪酸の嗜好性は種により異なることが判明した。

謝辞

本研究の実施に当たって、終始温かい御指導を頂きました京都大学 桑原保正教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究中、有益な助言・激励を頂いた筑波大学 鈴木隆久教授、ならびに松山 茂助手に厚く御礼申し上げます。また、本論文をまとめるにあたり、激励を頂いた香川大学 山崎 徹教授に心から感謝いたします。数多くの御協力を頂きました筑波大学 応用生物化学系 動物制御化学研究室内の皆様方、香川大学 農学部 生物資源科学科 天然資源化学研究室内の皆様方、ならびに京都大学 農学部附属 農薬研究施設の皆様方に心から感謝いたします。

引用文献

- 1) R. T. Carde and T. C. Baker, Sexual Communication with Pheromones, in "Chemical Ecology of Insect", ed. by W. J. Bell and R. T. Carde, Chapman and Hall, New York, 1984, pp. 355-387.
- 2) J. H. Law and F. E. Regnier, Pheromones, *Ann. Rev. Biochem.*, 40, 533-548 (1971).
- 3) D. E. Sonenshine, Pheromone and other semiochemicals of the acari, *Ann. Rev. Entomol.*, 30, 1-28 (1985).
- 4) B. S. Fletcher and T. E. Bellas, Pheromones of mites : Occurrence and components, in "CRC Handbook of Natural Pesticides. Vol. IV Pheromones Part B", ed. by E.D. Morgan, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988, pp. 246-261.
- 5) J. Boczek and D. A. Griffiths, Spermatophore production and mating behaviour in the stored product mites *Acarus siro* and *Lardoglyphus konoi*, in "Recent Advances in Acarology, Vol. I" ed. by J. G. Rodriguez, Academic Press, New York, 1978, pp. 279-284.
- 6) A. R. Levinson, H. Z. Levinson and U. Oelker, Two sex pheromones mediate courtship and mating in the flour mite, *Naturwissenschaften*, 76, 176-177 (1989).

- 7) W. S. Leal, Y. Kuwahara and T. Suzuki, β -Acaridial, the sex pheromone of the acarid mite *Caloglyphus polyphillae*. Pheromone study of acarid mites XXI., *Naturwissenschaften*, 76, 332-333 (1989).

- 8) Y. Kuwahara, M. Sato, T. Koshii and T. Suzuki, Chemical Ecology of Astigmatid Mites XXXII. 2-Hydroxy-6-methylbenzaldehyde, the sex pheromone of the brown legged-grain mite *Aleuroglyphus ovatus* (Troupeau) (Acarina : Acaridae), *Appl. Entomol. Zool.*, 27, 253-260 (1992).

- 9) M. Sato, Y. Kuwahara, S. Matsuyama and T. Suzuki, Male and female sex pheromones produced by *Acarus immobilis* Griffiths (Acaridae : Acarina). Chemical Ecology of Astigmatid Mites XXXIV., *Naturwissenschaften*, 80, 34-36 (1993).

- 10) K. Matsumoto, Studies on environmental factors for breeding of grain mites VII. Relationship between reproduction of mites and kind of carbohydrates in the diet., *Jpn. J. Sanit. Zool.*, 16, 118-122 (1965).

- 11) H. Buser, H. Arn, P. Guerin and S. Rauscher, Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfide adducts., *Anal. Chem.*, 55, 818-822 (1983).

- 12) M. Vincenti, G. Guglielmetti, G. Cassani and C. Tonini, Determination of double bond position in diunsaturated compounds by mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives., *Anal. Chem.*, 59, 694-699 (1987).

- 13) R. M. Silverstein, G. C. Bassler and T. C. Morrill, "Spectrometric Identification of Organic Compounds" 4th ed., John Wiley and Sons, New York, 1980, pp. 231, 265.
- 14) Y. Kuwahara, W. S. Leal and T. Suzuki, Pheromone study on astigmatid mites XXVI. Comparison of volatile components between *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Astigmata, Pyroglyphidae), *Jpn. J. Sanit. Zool.*, 41, 23-28 (1990).
- 15) W. S. Leal, Y. Kuwahara, T. Suzuki and H. Nakao, Chemical taxonomy of economically important *Tyrophagus* mites (Acariformes, Acaridae), *Agric. Biol. Chem.*, 53, 3279-3284 (1989).
- 16) R. F. Curtis, A. Hobson-Frohock, G. R. Fenwick, J. M. Berreen, Volatile compounds from the mite *Acarus siro* L. in food., *J. Stored. Prod. Res.*, 17, 197-203 (1981).
- 17) F. O. Ayorinde, J. W. Wheeler and R. M. Duffield, Synthesis of dehydrocineol, a new monoterpene from the acarid mite *Caloglyphus rodriguezi* (Arachnida : Acari), *Tetrahedron Lett.*, 25, 3525-3528 (1984).
- 18) W. S. Leal, Y. Nakano, Y. Kuwahara, H. Nakao and T. Suzuki, Pheromone study of acarid mites XVII. Identification of 2-hydroxy-6-methylbenzaldehyde as the alarm pheromone of the acarid mite *Tyrophagus perniciosus* (Acarina : Acaridae), and its distribution among related mites., *Appl. Entomol. Zool.*, 23, 422-427 (1988).

- 19) N. S. Narasimhan and S. P. Bhagwat, Synthetic application of lithiation reactions; Part XII. Synthesis of angular and linear 2-Oxo-2H-pyranoquinolines., *Synthesis*, 1976, 903-905.
- 20) M. Isobe and T. Goto, Synthesis of griforin, an antibiotic from a *Basidiomycete*, *Tetrahedron*, 24, 945-948 (1968).
- 21) R. L. Funk and K. P. C. Vollhardt, Cooligomerization of 3-substituted 1,5-hexadiynes with bis(trimethylsilyl)acetylene catalyzed by cobalt. A general synthesis of tricyclic ring systems from acyclic precursors., *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 5245-5253 (1980).
- 22) Y. Kuwahara, W. S. Leal, Y. Nakano, Y. Kaneko, H. Nakao and T. Suzuki, Pheromone study on acarid mites XXIII. Identification of the alarm pheromone of the acarid mite, *Tyrophagus neiswanderi* and species specificities of alarm pheromones among four species of the same genus., *Appl. Entomol. Zool.*, 24, 424-429 (1989).
- 23) M. Schwarz and R. M. Waters, Insect sex attractants; XII. An efficient procedure for the preparation of unsaturated alcohols and acetates., *Synthesis*, 1972, 567-568.
- 24) D. J. Cram and N. L. Allinger, Macro rings. XIII. Synthesis and Properties of 1,7-cyclododecadiyne and related compounds., *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 2518-2524 (1956).

- 25) P. E. Sonnet, Direct conversion of an alcohol tetrahydropyranyl ether to a bromide, chloride, methyl ether, nitrile or trifluoroacetate., *Synth. Comm.*, 6, 21-26 (1976).
- 26) T. E. Pliske and T. Eisner, Sex pheromone of the queen butterfly : Biology., *Science*, 164, 1170-1172 (1969).
- 27) R. M. Silverstein, Complexity, diversity, and specificity of behavior-modifying chemicals : exsamples mainly from Coleoptera and Hymenoptera. in "Chemical Control of Insect Behavior : Theory and Application", ed. by H. H. Shorey and J. J. McKelvey, Jr., Wiley-Intersci, 1976, pp. 231-251.
- 28) G. W. Wharton, House dust mites., *J. Med. Entomol.*, 12, 577-621 (1976).
- 29) T. A. E. Platts-Mills and M. D. Chapman, Dust mites : immunology, allergic disease and enviromental control., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 80, 755-775 (1987).
- 30) 宮本詢子, 大内忠行, 新築家屋, 一般家庭での室内塵ダニ類の季節変動について, *衛生動物*, 27, 251-259 (1976).
- 31) 高岡正敏, 石井 明, 梶沢靖弘, 大内忠行, 小児喘息患児の室内塵中のダニ相について, *衛生動物*, 28, 237-244 (1977).

- 32) M. Sato, Y. Kuwahara, S. Matsuyama and T. Suzuki, 2-Formyl-3-hydroxybenzyl formate (Rhizoglyphinyl formate), a novel salicylaldehyde analog from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* [Astigmata, Pyroglyphidae] ., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 1299-1301, (1993).
- 33) Y. Suzuki and H. Takahashi, Formylation of phenols with electron-withdrawing groups in strong acids. Synthesis of substituted salicylaldehydes., *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 1751-1753 (1983).
- 34) E. C. Taylor and C. S. Chiang, Trimethyl orthoformate absorbed on the montmorillonite clay K-10; an effective reagent for acetal formation., *Synthesis*, 1977, 467.
- 35) R. F. Cunico and L. Bedell, The triisopropylsilyl groups as a hydroxyl-protecting function., *J. Org. Chem.*, 45, 4797-4798 (1980).
- 36) E. J. Corey and A. Venkateswarlu, Protection of hydroxy group as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives., *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 6190-6191 (1972).
- 37) L. F. Fieser and M. Fieser, " Regents for Organic Synthesis", Vol.1, John Wiley and Sons, New York, 1976, pp. 4.
- 38) W. S. Leal, Y. Kuwahara and T. Suzuki, Hexyl 2-formyl-3-hydroxybenzoate, a fungitoxic cuticular constituent of the bulb mite *Rhizoglyphus robini*., *Agric. Biol. Chem.*, 54, 2593-2597 (1990).

- 39) Y. Kuwahara, Chemical studies on Astigmatid mites -opisthonotal gland secretions and body surface components with biological functions-, *J. Pesti. Sci.*, 15, 613-619 (1990).
- 40) L. K. Cole and M. S. Blum, Antifugal properties of the insect alarm pheromones, citral, 2-heptanone, and 4-methyl-3-heptanone, *Mycologia*, 67, 701-708 (1975).
- 41) Y. Kuwahara, W. S. Leal, and T. Suzuki, Antifugal activity of *Caloglyphus polyphillae* sex pheromone and other mite exudates. Pheromone study on astigmatid mites, XXIV., *Naturwissenschaften*, 76, 578-579 (1989).
- 42) B. P. Moore and W. V. Brown, The chemistry of the metasternal gland secretion of the common eucalypt longicorn, *Phoracantha semipunctata* (Coleoptera : Cerambycidae), *Aust. J. Chem.*, 25, 591-598 (1972).
- 43) B. P. Moore and W. V. Brown, Chemical composition of the defensive secretion in *Dyschirius bonelli* (Coleoptera : Carabidae : Scaritinae) and its taxonomic significance., *J. Aust. Ent. Soc.*, 18, 123-125 (1979).
- 44) M. S. Blum, "Chemical Defences of Arthropods", Academic Press, New York, 1981, pp. 212.
- 45) C. Gnanasunderam, H. Young and M. H. Benn, Defensive Secretions of New Zealand Tenebrionids-III, The identification of methyl esters of 6-methyl and 6-ethylsalicylic acid in *Chrysomelus expolitus* (Coleoptera : Tenebrionidae), *Insect. Biochem.*, 14, 159-161 (1984).

- 46) Y. Ninomiya and T. Kawasaki, Acarid attractant, *Japan Kokai Tokkyo Koho*, Syo 63-230605 (Sept. 27, 1988).
- 47) M. Sato, Y. Kuwahara, S. Matsuyama and T. Suzuki, Chemical ecology of astigmatid mites XXXVII. Fatty acid as food attractant of astigmatid mites, its scope and limitation., *Appl. Entomol. Zool.*, 28, 565-569, (1993).
- 48) T. Yoshizawa, I. Yamamoto and R. Yamamoto, Attractancy of some methyl ketones isolated from Cheddar cheese for cheese mites., *Bouchu-Kagaku*, 35, 43-45 (1970).
- 49) T. Yoshizawa, I. Yamamoto and R. Yamamoto, Synergistic attractancy of cheese components for cheese mite, *Tyrophagus putrescentiae*, *Bochu-Kagaku*, 36, 1-7 (1971).
- 50) M. Vanhaelen, R. Vanhaelen-Fastre, J. Geeraerts and T. Wirthlin, *Cis*- and *trans*-octa-1,5-diene-3-ol, new attractants to the cheese mite *Tyrophagus putrescentiae* (Schränk) (Acarina, Acaridae) identified in *Trichothecium roseum* (Fungi Imperfecti), *Microbios*, 23, 199-212 (1978).
- 51) M. Vanhaelen, R. Vanhaelen-Fastre and J. Geeraerts, Occurrence in mushrooms (Homobasidiomycetes) of *cis*- and *trans*-octa-1,5-dien-3-ol, attractants to the cheese mite *Tyrophagus putrescentiae* (Schränk) (Acarina : Acaridae), *Experimentia*, 36, 406-407 (1980).

- 52) D. Pankiewicz-Nowicka, J. Boczek and R. Davis, Attraction by selected organic compounds to *Tyrophagus putrescentiae* (Acari : Acaridae), *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 79, 293-299 (1986).
- 53) D. Pankiewicz-Nowicka, J. Boczek and R. Davis, Attraction of *Carpoglyphus lactis* (Acarina : Acaridae) to selected organic compounds, *Exp. Appl. Acarol.*, 3, 307-315 (1987).
- 54) Y. Le Conte, G. Arnold, J. Trouiller, C. Masson, B. Chappe and G. Ourisson, Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters, *Science*, 245, 638-639 (1989).
- 55) M. Rickli, P. M. Guerin and P.A. Diehl, Palmitic acid released from honeybee worker larvae attracts the parasitic mite *Varroa jacobsoni* on a servospere, *Naturwissenschaften*, 79, 320-322 (1992).
- 56) L. G. Arlian and D. L. Vyszenski-Moher, Response of *Sarcoptes scabiei* var. *canis* (Acari : Sarcoptidae) to lipids of mammalian skin, *J. Med. Entomol.*, 32, 34-41 (1995).